

MANIPULACIÓN DE LA SENESCENCIA DE ALFALFA (*Medicago sativa* L.) POR INGENIERÍA GENÉTICA

*Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires,
Área Producción Vegetal*

Victor Manuel Beltrán

Ingeniero Agrónomo – Universidad Nacional del Nordeste - 1999

Lugar de trabajo: EEA INTA Bella Vista – Corrientes y
CICVyA INTA Castelar – Instituto de Genética “Ewald A. Favret”



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Raúl Daniel Ríos

Ingeniero Agrónomo - Universidad de Buenos Aires

D.E.A. - Universidad de París - Sud (XI) Francia

Consejero de Estudios y Directora Interina

Elba María Pagano

Ingeniero Agrónomo - Universidad Nacional de La Plata

Magister Scientiae - Universidad Nacional de Rosario

JURADO DE TESIS

Director Interina de tesis

Elba María Pagano

Ingeniero Agrónomo - Universidad Nacional de La Plata

Magister Scientiae - Universidad Nacional de Rosario

JURADO

Yanovsky, Marcelo Javier

Licenciado en Ciencias Biológicas - Universidad de Buenos Aires

Doctor en Ciencias Biológicas - Universidad de Buenos Aires

JURADO

Grimoldi, Agustín Alberto

Ingeniero Agrónomo – Universidad de Buenos Aires

Doctor en Ciencias Agrarias - Technische Universität München

Fecha de defensa de la tesis: 12 de diciembre de 2011

Dedicatoria

Esta tesis se la dedico al amor de mi vida, mi esposa Lorena, quien me ha brindado siempre su apoyo, cariño y comprensión, sin ella no creo que hubiese podido realizarla.

También se la dedico a mis hijos Joaquín y Lautaro, mis cables a tierra, son el porqué de todo lo que hago para mejorar.

A mis padres Alicia y Canario, que me inculcaron la dedicación al trabajo, el valor al esfuerzo diario, el amor a la familia y el deseo de superación.

Quiero dedicar especialmente esta tesis a mi director de Tesis Raúl Daniel Ríos.

Agradecimientos

A mi Consejera de Estudios, mi Directora interina, mi guía, mi compañera de trabajo, mi compañera de viajes, mi amiga, mi correctora de tesis Elba Pagano, mi más profundo y sincero agradecimiento por todo lo que has hecho para que esta tesis se haya podido concretar, por tú buena y entera disposición, por hacer que estos años lejos de mí lugar de trabajo no se hayan notado, por tu calidez como persona y profesional, por dejarme formar parte del grupo de trabajo, por tus consejos seguros y certeros tanto en lo profesional, como en lo personal. Voy a estar eternamente agradecido.

A mi Director de Tesis Raúl Rios, por su amistad, confianza, apoyo necesario y su segura orientación durante estos años compartidos. Lamento con gran dolor tu partida, esto me llena de congoja y tristeza; pero creo que tu trabajo se verá reflejado en cada uno de tus tesistas. Siempre estarás en nuestra memoria.

A mis compañeras de trabajo, amigas y hermanas de la vida Cristi y Andy, por estos años compartidos, por las correcciones realizadas, por hacerme sentir parte del grupo, por brindarme su cariño, apoyo, contención y conocimientos. Gracias por brindarse tanto profesional como personalmente; creo haber encontrado en ustedes el ejemplo de calidad de persona y profesional.

A mis compañeras de trabajo, también mis amigas y hermanas menores de la vida Romi, Caro y Ara, por el apoyo y cariño que me dieron, gracias por dedicarme parte de sus tiempos para capacitarme. En ustedes también encontré esa calidad de persona y profesional, que hace que uno se sienta parte de grupo.

A mis compañeras de trabajo Carmen y Graciela, sin su colaboración no sería posible que nosotros podamos realizar nuestros trabajos, gracias por su apoyo. Excelentes personas y profesionales.

A los chicos de los invernáculo Juan y Guillermo, por mantener vivas las plantas, sin su colaboración tampoco sería posible poder realizar nuestros trabajos y comer un ricos asados.

A mis compañeros Ana, Ceci, Julián, Nico G., Marce, Nico A., Pato, Pablo y Romi C., con quienes compartí buenos momentos, gracias por su apoyo.

A mis modelos de persona y profesional Alicia y Polaco, por acercarme a esta gran Institución de Investigación, por permitirme compartir unos pocos años, pero muy fructíferos junto a ustedes. Por darme las herramientas necesarias para poder forjar mi carrera como investigador.

A mis hermanos Yohana, Rafael, Veruska, Mariana, Edgardo y Alfredo, a todos mis sobrinos, especialmente a José Alfredo y José Pedro, a mis cuñados Augusto y Fabio, porque cada uno a su manera colaboró con un granito de arena para que mi familia y yo nos sintiéramos a gusto y acompañados durante nuestra estadía en Buenos Aires.

A los profesionales y auxiliares de los diferentes grupos que conforman el IGEAF Paula, Ezequiel, Valeria, Ceci, Sara, Germán, Dalia, Gabriela, Ailín, Laura y Alicia, por su colaboración y apoyo.

Al Instituto de Genética “Ewald A. Favret”, sus directivos, secretarios, administrativos y profesionales, por el apoyo brindado.

A la EEA INTA, sus directivos, secretarios, administrativos y profesionales, por su apoyo y colaboración.

Declaración

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

INDICE GENERAL

Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Declaración	v
Índice de Tablas	xii
Índice de Figuras	xiii
Abreviaturas y Simbología	xvii
Resumen	xx
Abstract	xxi
Introducción	
1- La alfalfa	1
1.1- Origen	1
1.2- Morfología	1
1.3- Importancia económica	3
1.4- Valor nutricional	4
1.5- La alfalfa en la Argentina	4
2- Transformación genética de plantas	5
2.1- Identificación del gen	6
2.2- Clonado	6
2.3- Construcción del vector	7
2.4- Métodos de transformación	8
2.4.1- Transformación de plantas con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	8
2.4.1.1- Aspectos moleculares de la infección de <i>A. tumefaciens</i>	9
2.4.1.2- Utilización de genes marcadores seleccionables y reporteros	10
2.5- Cultivo <i>in vitro</i>	11
2.6- Análisis molecular del material transgénico	15
2.6.1- Detección de transgenes por PCR	15
2.6.2- Comprobación de la integridad del transgen	15
2.6.3- Detección de la transcripción del transgen	15
2.6.4- Análisis de la integración del ADN mediante la técnica de <i>Southern Blot</i>	15
3- Senescencia de las plantas	16
3.1- Senescencia foliar	16
3.1.1- Las citoquininas	17
3.1.2- Citoquininas biosíntesis y metabolismo	18
3.2- Regulación de la senescencia	18
3.2.1- Expresión del transgen <i>ipt</i>	18
3.3- Evaluación de la senescencia	19
3.3.1- Clorofila <i>a</i> y <i>b</i> – Cuantificación	19
3.3.2- Proteínas foliares solubles totales – Cuantificación	21
3.3.3- Análisis del perfil de las proteínas foliares totales a través de geles SDS-PAGE	24
4- Retraso de la senescencia	24

Hipótesis de trabajo	27
Objetivos	28
Objetivo General	28
Objetivos Particulares	28
 5- Materiales y Metodologías	 29
5.1- Material vegetal	29
5.2- Transformación de <i>A. tumefaciens</i> , caracterización y mantenimiento de las colonias	29
5.2.1- Cepas de <i>A. tumefaciens</i>	29
5.2.2- Vectores Binarios	29
5.2.3- Transformación de <i>A. tumefaciens</i>	30
5.2.4- Caracterización de colonias de <i>A. tumefaciens</i>	30
5.2.4.1- Caracterización molecular	31
5.2.4.1.1- Extracción de ADN de <i>A. tumefaciens</i>	31
5.2.4.1.2- Detección de los genes <i>virC</i> , <i>nptII</i> , <i>ipt</i> y <i>gusA</i> por PCR	31
5.2.4.1.3- Análisis de los productos de amplificación por PCR	32
5.2.4.1.4- Digestiones del ADN plasmídico con enzimas de restricción	33
5.2.4.1.5- Análisis de los productos de digestión	33
5.2.4.2- Caracterización bioquímica	33
5.3- Obtención de plantas transgénicas de alfalfa vía <i>A. tumefaciens</i>	34
5.3.1- Explante Vegetal	34
5.3.1.1- Preparación de los pecíolos utilizados como blanco de transformación	34
5.3.1.2- Obtención de embriones somáticos utilizados como blanco de transformación	34
5.3.2- Cultivo Bacteriano	35
5.3.3- Transformación de explantes y obtención de plantas transgénicas	35
5.4- Análisis molecular de plantas transgénicas	35
5.4.1- Detección de transgenes mediante la técnica de PCR	36
5.4.1.1- Extracción de ADN vegetal	36
5.4.1.2- Cuantificación de ADN	36
5.4.1.3- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	36
5.4.1.4- Análisis de los productos de amplificación por PCR	37
5.4.2- Detección de la actividad transcripcional por RT-PCR	37
5.4.2.1- Extracción de ARN	37
5.4.2.2- Análisis cualitativo y cuantitativo del ARN	38
5.4.2.3- Tratamiento con ADNs	38
5.4.2.4- Detección de la actividad transcripcional por RT-PCR con kit Ge Healthcare	38
5.4.2.5- Análisis de los productos de amplificación por RT-PCR	39
5.4.3- Análisis de la integración de ADN mediante la técnica de <i>Southern blot</i>	39
5.4.3.1- Extracción de ADN vegetal	39
5.4.3.2- Cuantificación de ADN vegetal	39
5.4.3.3- Síntesis de la sonda	39
5.4.3.3.1- Visualización del producto de PCR de la sonda	40
5.4.3.3.2- Purificación del producto de PCR	40
5.4.3.3.3- Cuantificación de la sonda	41
5.4.3.4- Acondicionamiento del ADN para la transferencia e hibridación	41

5.4.3.4.1- Digestión del ADN vegetal	41
5.4.3.4.1.1- Visualización del producto de digestión	41
5.4.3.4.2- Purificación del ADN digerido	41
5.4.3.4.3- Siembra de las muestras	41
5.4.3.4.4- Transferencia	42
5.4.3.4.5- Fijación	42
5.4.3.4.6- Hibridación	42
5.4.3.5- Detección de la sonda	42
5.4.3.5.1- Revelado	42
5.4.3.5.2- Estripeno	42
5.5- Evaluación del patrón de expresión del promotor AtMYB32 en alfalfa	42
5.5.1- Visualización tinción histoquímica	43
5.5.2- Procedimiento tinción histoquímica	43
5.6- Evaluación de la senescencia	43
5.6.1- Bioensayos de hojas cortadas	43
5.6.1.1- Ajustes de protocolo para bioensayos	43
5.6.2- Cuantificación de clorofila <i>a</i> y <i>b</i> por espectrofotometría	45
5.6.3- Cuantificación de las proteínas foliares solubles totales y análisis del perfil de las proteínas foliares	45
5.6.3.1- Extracción proteínas foliares	46
5.6.3.2- Cuantificación de proteínas foliares solubles totales	46
5.6.3.3- Preparación de geles SDS-PAGE para análisis de los perfiles de proteínas foliares	46
5.6.3.4- Acondicionamiento de las muestra de proteínas y siembra de las mismas	47
5.6.3.5- Visualización por tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250.	47
5.6.3.6- Procedimiento tinción con azul brillante Coomasie	47
5.7- Análisis estadístico	47
6- Resultados	49
6.1- Transformación de <i>A. tumefaciens</i> y caracterización de las colonias obtenidas.	49
6.1.1- Detección de los genes <i>virC</i> , <i>nptII</i> , <i>ipt</i> y <i>gusA</i> por PCR	49
6.1.2- Digestiones del ADN plasmídico con enzimas de restricción	51
6.1.3- Caracterización Bioquímica – Prueba de Cetolactosa	52
6.2- Obtención de plantas transgénicas de alfalfa	53
6.2.1- Transformación genética de pecíolos y embriones somáticos con el transgen AtMYB32- <i>ipt</i>	55
6.2.2- Transformación de pecíolos y embriones con el transgen AtMYB32- <i>gus</i>	57
6.2.3- Transformación de pecíolos en paralelo con las construcciones AtMYB32- <i>gus</i> y 35S- <i>gus</i>	58
6.3- Análisis molecular de las plantas transgénicas obtenidas	59
6.3.1- Detección del transgen AtMYB32- <i>ipt</i> y AtMYB32- <i>gusA</i> por PCR	59
6.3.2- Detección de la actividad transcripcional en las plantas transgénicas AtMYB32- <i>ipt</i> por RT-PCR	61
6.3.3- Análisis de la integración de ADN mediante la técnica de <i>Southern blot</i>	63
6.3.3.1- Cuantificación ADN vegetal	63
6.3.3.2- Síntesis de la Sonda <i>ipt</i>	63
6.3.3.3- Cálculos para digestión con enzima de restricción <i>HindIII</i>	63
6.3.3.4- Verificación de la digestión de ADN con la enzima <i>HindIII</i>	64

6.3.3.5- Observación corrida del producto de purificación de las digestiones	64
6.3.3.6- Transferencia	64
6.3.3.7- Hibridación molecular y Revelado	64
6.4- Evaluación del patrón de expresión del promotor <i>AtMYB32-gus</i> en alfalfa	65
6.4.1- Evaluación expresión <i>gus</i> en explantes transformados con los transgenes <i>AtMYB32-gus</i> y <i>35S-gus</i>	65
6.5- Evaluación de la Senescencia	66
6.5.1- Bioensayos de hojas cortadas	66
6.5.1.1- Bioensayos de plantas transgénicas <i>AtMYB32-ipt</i>	67
6.5.2- Cuantificación de Clorofila <i>a</i> y <i>b</i> por espectrofotometría	68
6.5.2.1- Análisis estadístico del contenido de Clorofila <i>a</i> y <i>b</i> del experimento 1 de los bloques I, II, III y IV	68
6.5.2.2- Análisis estadístico del contenido de Clorofila <i>a</i> y <i>b</i> del experimento 2 de los bloques I y II	69
6.5.3- Cuantificación de proteínas foliares solubles totales por Fluorometría	71
6.5.3.1- Cuantificación de proteínas foliares solubles totales del experimento 1 de los bloques I, II, III y IV	71
6.5.3.2- Cuantificación de proteínas foliares solubles totales del experimento 2 de los bloques I y II	72
6.5.4- Análisis de cambios en el perfil de las proteínas foliares a través de geles SDS-PAGE 10%	72
6.5.4.1- Análisis de cambios en el perfil de proteínas foliares del experimento 1 de los bloques I, II, III y IV	72
6.5.4.2- Análisis de cambios en el perfil de las proteínas foliares del experimento 2 de los bloques I y II	74
Discusión	76
Conclusiones finales	84
Bibliografía	86
ANEXO 1 –Protocolos	97
A 1.1- Transformación de <i>A. tumefaciens</i>	97
A 1.2- Extracción de ADN de <i>A. tumefaciens</i>	97
A 1.3- Extracción de ADN vegetal	98
A 1.4- Extracción de ARN	98
A 1.5- Detección de la actividad transcripcional por RT-PCR con kit Ge Healthcare	99
A 1.6- Purificación del producto de PCR (Sonda)	99
A 1.7- Cuantificación de la sonda	100
A 1.8- Extracción de ADN vegetal	100
A 1.9- Cuantificación de ADN vegetal	100
A 1.10- Purificación del ADN digerido	101
A 1.11- Transferencia a membrana de nylon	101
A 1.12- Fijación del ADN a la membrana de nylon	101
A 1.13- Hibridación de la sonda al ADN	101
A 1.14- Detección de la sonda	102
A 1.15- Estripeo de la membrana	102
A 1.16- Desinfección y siembra del material a evaluar	102
A 1.17- Extracción de clorofila	102
A 1.18- Extracción proteínas foliares	103

A 1.19- Cuantificación de proteínas solubles totales	103
A 1.20- Preparación de geles SDS-PAGE	103
ANEXO 2- Resultados cuantificación Clorofila <i>a</i> y <i>b</i> – Proteínas Foliare	104
Totales – Salidas estadístico SAS	
A 2.1- Valores de absorbancia, porcentaje de contaminación, concentración ADN	104
A 2.2- Concentraciones de los ADN de las muestras para <i>Southern</i>	104
A 2.3- Cálculos de μ l de ADN a utilizar en las reacciones con y sin enzima (<i>HindIII</i>)	104
A 2.4- Características d las reacciones de digestión de los ADN para <i>Southern</i>	104
A 2.5- Resultados cuantificación clorofila <i>a</i> y <i>b</i> expresado en μ g de clorofila/ml de solución (μ g*ml ⁻¹)	105
A 2.6- Resultados cuantificación Proteínas Foliare Totales expresadas en mg/ml	107
A 2.7- Salida análisis estadístico ANOVA y Test de comparación de media Tukey – SAS	108
A 2.7.1- Análisis de Clorofila <i>a</i> y <i>b</i> – Experimentos 1 y 2	108
A 2.7.1.1- Experimento 1 – Bloque I, II, III y IV - Clorofila <i>a</i>	108
A 2.7.1.1.1- Clorofila <i>a</i> día 0 bloques I, I I, II y IV	108
A 2.7.1.1.2- Clorofila <i>a</i> día 35 bloques I, II, III y IV	109
A 2.7.1.2- Experimento 2 – Bloque I y II - Clorofila <i>a</i>	111
A 2.7.1.2.1- Clorofila <i>a</i> día 0 bloques I y II	111
A 2.7.1.2.2- Clorofila <i>a</i> día 35 bloques I y II	111
A 2.7.2.1- Experimento 1 – Bloque I, II, III y IV - Clorofila <i>b</i>	113
A 2.7.2.1.1- Clorofila <i>b</i> día 0 bloques I, II, III y IV	113
A 2.7.2.1.2- Clorofila <i>b</i> día 35 bloques I, II, III y IV	115
A 2.7.2.2- Experimento 2 – Bloque I y II- Clorofila <i>b</i>	117
A 2.7.2.2.1- Clorofila <i>b</i> día 0 bloques I y II	117
A 2.7.2.2.2- Clorofila <i>b</i> día 35 bloques I y II	117
A 2.8- Análisis de Proteínas Foliare Totales Experimento 1 y 2	119
A 2.8.1- Experimento 1 – Bloque I, II, III y IV – Proteínas	119
A 2.8.1.1- Proteínas foliare totales día 0 bloques I, II, III y IV	119
A 2.8.1.2- Proteínas foliare totales día 35 bloques I, II, III y IV	120
A 2.8.2- Experimento 2 – Bloque I y II- Proteínas	121
A 2.8.2.1- Proteínas foliare totales día 0 bloques I y II	121
A 2.8.2.2- Proteínas foliare totales día 35 bloques I y II	122
ANEXO 3- Soluciones Medios de cultivo - <i>Southern blot</i> - Proteínas Foliare - X-Gluc - Geles SDS-PAGE - Marcador 1Kb <i>ladder</i> – Marcador de referencia para proteínas #SMO441 – Marcador MKIII <i>Southern blot</i>	123
A 3.1- Medios de cultivo para material vegetal expresado en mg/l	123
A 3.2- Medios cultivo bacterias	124
A 3.3- Antibióticos	124
A 3.4- Marcador de peso molecular 1Kb ADN <i>ladder</i> de Invitrogen	125
A 3.5- Soluciones para <i>Southern blot</i>	125
A 3.6- Tinción Histoquímica X-Gluc	127
A 3.7- Soluciones para Extracción de Proteínas Foliare	127
A 3.8- Soluciones para Geles SDS-PAGE	127

A 3.9- Marcador de referencia para proteína #SMO441 – Fermentas	128
A 3.10- Marcador MKIII utilizado en <i>Southern blot</i>	128
A 3.11- Etapas de la reacción de PCR	129
A 3.12- Componentes de la PCR	130
A 3.13- Hibridación molecular por <i>Southern</i>	130

INDICE DE TABLAS

Tabla 1- Composición nutricional de la materia seca de alfalfa.	4
Tabla 2- Superficie (en miles de hectáreas) cultivada con alfalfa pura, alfalfa consociada con otras forrajeras, y total de pasturas en la Región Pampeana. Adaptado de INDEC 2002.	5
Tabla 3- Componentes para medios de cultivo	12
Tabla 4- Proceso de senescencia en diferentes estados de desarrollo de la planta.	16
Tabla 5- Principales métodos para la cuantificación de proteínas, principales ventaja y desventajas.	23
Tabla 6- Características de la reacción de PCR.	31
Tabla 7- Secuencias de <i>primers</i> para los genes <i>virC</i> y <i>nptII</i> .	32
Tabla 8- Programas de ciclado de PCR para los genes <i>virC</i> y <i>nptII</i> .	32
Tabla 9- Secuencias de <i>primers</i> para los genes <i>gusA</i> e <i>ipt</i> .	32
Tabla 10- Programas de ciclado de PCR para los genes <i>gusA</i> e <i>ipt</i> .	32
Tabla 11- Esquemas de digestiones con enzimas de restricción <i>HindIII</i> y <i>BamHI</i> .	33
Tabla 12- Características de reacción de digestión de los plásmidos.	33
Tabla 13- Características de los <i>primers</i> utilizados para la detección de genes.	36
Tabla 14- Condiciones de reacción de PCR.	37
Tabla 15- Condiciones de ciclado para <i>virC</i> , <i>nptII</i> , <i>gusA</i> e <i>ipt</i> .	37
Tabla 16- Características de las reacciones de digestión con ADNsa.	38
Tabla 17- Condiciones de ciclado para <i>ipt</i> .	39
Tabla 18- Características de las reacciones de PCR para síntesis de sonda.	40
Tabla 19- Condiciones de ciclado para la síntesis de la sonda.	40
Tabla 20- Características de reacción de digestión de ADN vegetal para <i>Southern</i> .	41
Tabla 21- Componentes para la preparación de los geles de separación y concentración SDS-PAGE.	46
Tabla 22- Caracterización por PCR de las colonias de <i>A. tumefaciens</i> obtenidas por electroporación, con los vectores binarios AtMYB32- <i>ipt</i> y AtMYB32- <i>gus</i> .	49
Tabla 23- Experimentos de transformación con el transgen AtMYB32- <i>ipt</i> .	56
Tabla 24- Transformaciones con el transgen AtMYB32- <i>gus</i> .	58
Tabla 25- Transformaciones en paralelo con las construcciones AtMYB32- <i>gus</i> y 35S <i>gus</i> .	58
Tabla 26- Test de comparación de medias de Tukey, clorofila <i>a</i> y <i>b</i> a los 35 días. Experimento 1. Unidad de medida expresada en μg de clorofila/ml ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).	69
Tabla 27- Test de comparación de medias de Tukey, clorofila <i>a</i> y <i>b</i> a los 35 días. Experimento 2. Unidad de medida expresada en μg de clorofila/ml ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).	71
Tabla 28- Test de comparación de medias de Tukey, proteínas totales a los 35 días. Experimento 2. Unidad de medida mg/ml ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$).	72

INDICE DE FIGURAS

Figura 1- Morfología de la alfalfa. a) Tallo erecto, b) Inflorescencia, c) Hoja trifoliada, d) Frutos y e) Semillas.	3
Figura 2- Esquema simplificado de los pasos en la construcción de vectores recombinantes.	7
Figura 3- Agallas producidas por a) <i>A. tumefaciens</i> , b) <i>A. rhizogenes</i> .	9
Figura 4- Diagrama de la célula de <i>A. tumefaciens</i> .	9
Figura 5- Esquema del plásmido Ti.	10
Figura 6- Estructura molecular de la clorofila <i>a</i> y clorofila <i>b</i> .	20
Figura 7- Picos de absorción en el espectro visible y longitud de onda. Clorofila <i>a</i> y <i>b</i> .	21
Figura 8- Mapa de restricción del T-DNA del vector binario pAtMYB32- <i>ipt</i> .	29
Figura 9- Mapa de restricción del T-DNA del vector binario pAtMYB32- <i>gusA</i> .	30
Figura 10- Estados embriones somáticos de alfalfa. A) Globular, B) Corazón y C) Torpedo.	34
Figura 11 a- Esquema tomado en cuenta para establecer la posición de cada hoja.	44
Figura 11 b- Esquema siembra de hojas para bioensayos. Conformación de los futuros bloques.	44
Figura 12- Detección por PCR del gen <i>virC</i> (730 pb) en colonias de <i>A. tumefaciens</i> . 1- 1 kb <i>ladder</i> (Invitrogen); 2- reacción sin ADN (mix); 3- colonia AtMYB32- <i>ipt</i> , cepa C58C1RifpGV2260; 4- colonia AtMYB32- <i>ipt</i> , cepa LBA4404; 5- colonia AtMYB32- <i>gus</i> , cepa AGL1 y 6- colonia 2 AtMYB32- <i>gus</i> , cepa LBA4404.	49
Figura 13- Detección por PCR del gen <i>nptII</i> (343 pb) en colonias de <i>A. tumefaciens</i> . 1- 1 kb <i>ladder</i> (Invitrogen); 2- colonia AtMYB32- <i>ipt</i> , cepa C58C1RifpGV2260; 3- colonia AtMYB32- <i>ipt</i> , cepa LBA4404; 4- colonia AtMYB32- <i>gus</i> , cepa AGL1; 5- colonia AtMYB32- <i>gus</i> , cepa LBA4404; 6- plásmido AtMYB32- <i>ipt</i> (control positivo); 7- plásmido no relacionado (control negativo) y 8- reacción sin ADN (mix).	50
Figura 14- Detección por PCR del gen <i>ipt</i> (583 pb) en colonias de <i>A. tumefaciens</i> . 1- 1 kb <i>ladder</i> (Invitrogen); 2- reacción sin ADN (mix); 3- plásmido no relacionado (control negativo); 4- plásmido AtMYB32- <i>ipt</i> (control positivo); 5- colonia 1 AtMYB32- <i>ipt</i> , cepa C58C1RifpGV2260; 6- colonia 1 AtMYB32- <i>ipt</i> , cepa AGL1; 7- colonia 1 AtMYB32- <i>ipt</i> , cepa LBA4404.	50
Figura 15- Detección por PCR del gen <i>gusA</i> (1089 pb) en colonias de <i>A. tumefaciens</i> . 1- 1 kb <i>ladder</i> (Invitrogen); 2- reacción sin ADN (mix); 3- plásmido AtMYB32- <i>ipt</i> (control negativo); 4- plásmido 35S <i>gus</i> (control positivo); 5- colonia 1 AtMYB32- <i>gus</i> , cepa AGL1; 6- colonia 1 AtMYB32- <i>gus</i> , cepa C58C1RifpGV2260; 7- colonia 1 AtMYB32- <i>gus</i> , cepa LBA4404 y 8- plásmido 35S <i>gus</i> (control positivo).	50
Figura 16- Digestión del vector binario AtMYB32- <i>ipt</i> con enzimas <i>HindIII</i> y <i>BamHI</i> . 1- 1kb <i>ladder</i> (Invitrogen), 2- pAtMYB32- <i>ipt</i> sin digerir, 3- pAtMYB32- <i>ipt</i> digerido con <i>HindIII</i> y 4- pAtMYB32- <i>ipt</i> digerido con <i>BamHI</i> .	51
Figura 17- Digestión del vector binario AtMYB32- <i>gus</i> con enzimas <i>HindIII</i> y <i>BamHI</i> . 1- 1kb <i>ladder</i> (Invitrogen), 2- pAtMYB32- <i>gus</i> sin digerir, 3- pAtMYB32- <i>gus</i> digerido con <i>HindHI</i> y 4- pAtMYB32- <i>gus</i> digerido con <i>BamHI</i> .	52

Figura 18- Prueba Cetolactosa. A) Colonias crecidas a 28°C, B) Colonias con reactivo de Benedict presencia de halo amarillento en colonias AtMYB32- <i>ipt</i> y AtMYB32- <i>gus</i> .	52
Figura 19- Esquema de transformación genética a partir de pecíolos.	53
Figura 20- Esquema de transformación genética a partir de embriones somáticos.	54
Figura 21- A y B) Embriones malformados, C) Planta anormal desarrollada a partir de embrión malformado y D) Planta anormal desarrollada sin sistema radicular y tejido necrosado.	55
Figura 22- A) Regeneración de embriones a partir de segmentos de pecíolos transformados, B) Desarrollo de embriones en medio MS [1/2], C) Planta normal desarrollada a partir de un embrión y D) Planta normal desarrollada con buen sistema radicular, lista para ser rustificada.	55
Figura 23- A) Regeneración de embriones a partir de folíolos para ser utilizados como blanco de transformación, B) Embriones transformados en medio selectivo y C) Regeneración de callos y embriones a partir de embriones transformados.	56
Figura 24- Cuantificación de ADN de plantas transgénicas. 1- ADN λ <i>Hind</i> III [100 ng/ μ l]; 2- muestra 1; 3- muestra 2; 4- muestra 3; 5- muestra 4 y 6- ADN λ <i>Hind</i> III [300 ng/ μ l].	59
Figura 25- Detección por PCR del gen <i>tubulina</i> (550 pb) en plantas transgénicas. 1- 1kb <i>ladder</i> (Invitrogen), 2- reacción sin ADN (mix), 3- plásmido (control negativo), 4- planta no transgénica C2-3 (control positivo) (ADN C2-3), 5 al 19 plantas transgénicas y 20- 1kb <i>ladder</i> (Invitrogen).	60
Figura 26- Detección por PCR del transgen <i>nptII</i> (343 pb) en plantas transgénicas. 1- 1kb <i>ladder</i> (Invitrogen), 2- reacción sin ADN (mix), 3- planta no transgénica C2-3 (control negativo), 4- plásmido pAtMYB32- <i>ipt</i> (control positivo) y 5 al 18 plantas transgénicas.	60
Figura 27- Detección por PCR del transgen <i>ipt</i> (583 pb) en plantas transgénicas. 1- 1kb <i>ladder</i> (Invitrogen), 2- reacción sin ADN (mix), 3- planta no transgénica C2-3 (control negativo), 4- plásmido pAtMYB32- <i>ipt</i> (control positivo), 5 al 19 plantas transgénicas y 20- 1kb <i>ladder</i> (Invitrogen).	61
Figura 28- Detección por PCR del transgen <i>gusA</i> (1089 pb) en plantas transgénicas. 1- 1kb <i>ladder</i> (Invitrogen), 2- reacción sin ADN (mix), 3- planta no transgénica C2-3 (control negativo), 4- plásmido pAtMYB32- <i>gus</i> (control positivo) y 5 al 18 plantas transgénicas.	61
Figura 29- Verificación integridad del ARN. 1- planta no transgénica (C2-3), 2- sene 5, 3- sene 9, 4- sene 4, 5- sene 12, 6- sene 11 y 7- sene 10.	62
Figura 30- RT-PCR de plantas transgénicas <i>ipt</i> . 1- 1 kb <i>ladder</i> (Invitrogen), 2- control positivo (plásmido pAtMYB- <i>ipt</i>), 3- planta no transgénica (C2-3), 4- control negativo* planta no transgénica (C2-3), 5- sene 4, 6- control negativo* sene 4, 7- sene 10, 8- control negativo* sene 10, 9- sene 12, 10- control negativo* sene 12, 11- sene 5, 12- control negativo* sene 5, 13- sene 9, 14- control negativo* sene 9, 15- sene 11, 16- control negativo* sene 11 *Controles negativos (transcriptasa reversa inactivada).	62
Figura 31- Producto de PCR - Síntesis de Sonda <i>ipt</i> . 1- 1 kb <i>ladder</i> (Invitrogen), 2- ADN sin marcar, 3- ADN marcado 1° reacción, 4- ADN marcado 2° reacción y 5- ADN marcado 3° reacción.	63
Figura 32- Verificación digestión de ADN genómico de plantas. 1- planta no transgénica (C2-3) digerido, 2- planta no transgénica (C2-3) sin digerir, 3- sene	64

4 digerido, **4-** sene 4 sin digerir, **5-** sene 10 digerido, **6-** sene 10 sin digerir, **7-** sene 12 digerido y **8-** sene 12 sin digerir.

Figura 33- Corrida electroforética de ADNs digeridos y no digeridos. **1-** 1 kb *ladder* (Invitrogen), **2-** ADN planta no transgénica (C2-3) sin digerir, **3-** ADN planta no transgénica (C2-3) digerido, **4-** ADN sene 4 sin digerir, **5-** ADN sene 4 digerido, **6-** ADN sene 10 sin digerir, **7-** ADN sene 10 digerido, **8-** ADN sene 12 sin digerir, **9-** ADN sene 12 digerido, **10-** ADN plásmido pAtMYB *ipt* y **11-** Marcador MK III. 64

Figura 34- Revelado en placa radiográfica *Southern blot* de plantas *ipt*. **1-** ADN genómico sin digerir de planta no transgénica (C2-3); **2-** ADN genómico digerido de planta no transgénica (C2-3), **3-** ADN genómico sin digerir de planta transgénica sene 4; **4-** ADN genómico digerido de planta transgénica sene 4; **5-** ADN genómico sin digerir de planta transgénica sene 10; **6-** ADN genómico digerido de planta transgénica sene 10; **7-** ADN genómico sin digerir de planta transgénica sene 12; **8-** ADN genómico digerido de planta transgénica sene 12; **9-** ADN plasmídico AtMYB32-*ipt* y **10-** Marcador de peso molecular MKIII (*DNA Molecular Weight Marker III, Dioxigenin-labeled*) 65

Figura 35- Tinción *gus* promotor 35S-*gus*. **A)** Corte transversal de raíz y **B)** Raíz principal y raicillas. 65

Figura 36- Tinción *gus* promotor AtMYB32-*gus*. **A)** Estipulas, **B)** Folíolo y **C)** Raicillas. 66

Figura 37- Comparación tinción en raíces AtMYB32-*gus* y 35S-*gus*. **A)** Izquierda 35S y derecha AtMYB32 y **B)** Izquierda AtMYB32 y derecha 35S. 66

Figura 38- Comparación tinción en pecíolos AtMYB32-*gus* y 35S-*gus*. **A)** Izquierda 35S y derecha AtMYB32, **B)** Izquierda 35S y derecha AtMYB32 y **C)** Izquierda 35S y derecha AtMYB32. 66

Figura 39- Plantas madres C2-3, C2-4 y 19/17, hojas desde la 1ª a la 10ª sembradas en placas de Petri con agar-agua como medio de soporte. 67

Figura 40- Hojas de planta transgénica sene 4, controles negativos C2-3 y 19/17. Hojas sembradas en placas de Petri con agar-agua como medio de soporte. **A)** A los 14 días de iniciado el ensayo y **B)** A los 28 días. 67

Figura 41- Hojas de planta transgénica sene 4, controles negativos C2-3 y 19/17. Hojas sembradas en placas de Petri con agar-agua como medio de soporte. **A y B)** A los 28 días de iniciado el ensayo. 68

Figura 42- Hojas de plantas transgénicas sene 4, sene 5, sene 9, sene 10, sene 11 y sene 12 a los 30 días de iniciado el experimento. 68

Figura 43- Concentración promedio de Clorofila *a* del experimento 2, al inicio (día 0), a los 14 días y al finalizar el experimento (día 35). 70

Figura 44- Concentración promedio de Clorofila *b* del experimento 2, al inicio (día 0), a los 14 días y al finalizar el experimento (día 35). 70

Figura 45- Perfil proteínas foliares. Experimento 1–Bloque I. **1-** BSA [1ug], **M-** Marcador peso molecular. **d0-** día 0, **d35-** día 35. 73

Figura 46- Perfil proteínas foliares. Experimento 1- Bloque I. **M-** Marcador peso molecular, **2-** BSA [1ug], **d0-** día 0, **d35-** día 35. 73

Figura 47- Perfil proteínas foliares. Experimento 1-Bloque II. **1-** BSA [1ug], **M-** Marcador peso molecular. **d0-** día 0, **d35-** día 35. 73

Figura 48- Perfil de proteínas foliares. Experimento 1- Bloque II. **1-** Marcador peso molecular, **2-** BSA [1ug], **d0-** día 0, **d35-** día 35. 73

Figura 49- Perfil proteínas foliares. Experimento 1-Bloque III. **1-** BSA [1ug], **M-** Marcador peso molecular, **d0-** día 0, **d35-** día 35. 73

Figura 50- Perfil proteínas foliares. Experimento 1- Bloque III. M- Marcador peso molecular, 2- BSA [1ug], d0- día 0, d35- día 35.	73
Figura 51- Perfil proteínas foliares. Experimento 1-Bloque IV. 1- BSA [1ug], 2- Marcador peso molecular, d0- día 0, d35- día 35.	74
Figura 52- Perfil proteínas foliares. Experimento 1-Bloque IV. M- Marcador peso molecular, 2- BSA [1ug], d0- día 0, d35- día 35.	74
Figura 53- Perfil proteínas foliares. Experimento 2-Bloque I. 1- BSA [1ug], M- Marcador peso molecular.	74
Figura 54- Perfil proteínas foliares. Experimento 2- Bloque I. M- Marcador peso molecular, 2- BSA [1ug].	74
Figura 55- Perfil proteínas foliares. Experimento 2-Bloque I. 1- BSA [1ug], M- Marcador peso molecular.	75
Figura 56- Perfil proteínas foliares. Experimento 2-Bloque II. M- Marcador peso molecular, 2- BSA [1ug].	75

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

ADN: ácido desoxirribonucleico
 ADN-T: ácido desoxirribonucleico de transferencia
 APS: Persulfato de amonio (*ammonium persulfate*)
 ARN: ácido ribonucleico
 ANOVA. Análisis de varianza
 BSA: Suero albúmina bovina (*Bovine serum albumin*)
 CDP star: sustrato quimioluminiscente para fosfatasa alcalina
 CICVyA: Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas
 CIMMYT: Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo
 cm: centímetros
 cm²: centímetros cuadrados
 CTAB: mixed alkyltrimethyl-ammonium bromide
 dATP: deoxyadenosine 5'-triphosphate
 dCTP: deoxycytidine 5'-triphosphate
 dGTP: deoxyguanosine 5'-triphosphate
 Dig: dioxigenina (*digoxigenin*)
 Dig-dUTP: Dioxigenina-11-deoxiuridina 5`trifosfato
 dNTPs: deoxynucleoside 5'-triphosphates
 DNTPs: deoxinucleósidos tri-fosfatos
 DO: densidad óptica
 dTTP: deoxytiamine 5`-triphosphate
 dUTP: deoxyuridine 5'-triphosphate
 dUTP dig: digoxigenin-11-dUTP
 EB: *Buffer* de extracción
 EDTA: Etilendiaminotetracético
 EtBr: Bromuro de etidio (*ethidium bromide*)
 EtOH: etanol
 g: gramos
gus A: gen codificante de la enzima β-glucuronidasa
 h: horas
 ha: hectárea
 HPLC: cromatografía líquida de alta performance
 IGFAF: Instituto de Genética “Ewald A. Favret”
 INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
ipt: isopentenil transferasa
 kg: kilogramos
 Kb: kilobases
 l: litros
 m: metro
 mA: milli Amperes
 M: molar
 mm: milímetro
 MinA: medio mínimo para bacteria
 mix: reacción de PCR sin ADN
 mg: miligramos
 mARN: ARN mensajero
 mM: milimolar

MS: materia seca
 MS: medio de Murashige-Skoog
 MS[1/2]: medio de Murashige-Skoog a mitad de concentración
 ng: nanogramos = 10^{-9} g
 nm: nanómetros = 10^{-9} m
nptII: neomicin fosfotransferasa II
 onc: oncogénica
 ops: opinas
 opc: catabolismo de opinas
 p: página
 pb: pares de base
 PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)
 pH: producto hidrógeno
 p.e: por ejemplo
 PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (*phenylmethylsulfonyl fluoride*)
 p/v: peso en volumen
 rpm: revoluciones por minuto
 rARNs: ácidos ribonucleicos ribosómicos
 RT: retro transcriptasa
 RT-PCR: Retro transcriptasa – reacción en cadena de la Polimerasa (*Reverse Transcription - Polymerase - Chain Reaction*)
 SARGs: Genes Asociados a la Regulación de la Senescencia
 SARK: Receptor Kinasa Asociado a la Senescencia
 SAS: Software de estadística aplicada
 SDS: Dodecyl sulfato sódico
 SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulphate- polyacrylamide gel electrophoresis*
 SHK: medio de cultivo de Schenk and Hildebrandt modificado
 SSC: Citrato Salino Estándar (*Standard Saline Citrate*)
 S: sur
 T(0): plantas transgénicas proveniente de cultivo *in vitro*
 Taq polimerasa: ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*
 TBS: Tris Buffer Salino (*Phosphate buffered saline*)
 TAE: *Buffer* tris-acetate EDTA
 TE: *Buffer* tris-EDTA
 TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
 Tris: Tris (hydroxymethyl) amino-methane
 TTE: Triton Tris-EDTA (buffer)
 ton: toneladas
 ton/MS/ha: toneladas de materia seca por hectárea
 tARNs: ácidos ribonucleicos de transferencia
 U: unidad
 UV: ultravioleta
 UVP: Transiluminador y capturador de imágenes con ultravioleta
 v/v: volumen en volumen
vir C: gen de virulencia C de *A. tumefaciens*
 Volts: voltios
 W: oeste
 X-Gluc: reactivo ácido glucurónico
 YMB: medio enriquecido para bacterias
 2-4 D: ácido 2-4 diclorofenoxiacético

%.: porcentaje

°C: grados centígrados

μF: microfaradios

μl: microlitros = 10^{-6} l

μg: microgramos = 10^{-6} g

μM: micromolar = 10^{-6} molar

λ: fago lambda (estándar para concentración ADN)

Ω: omega (ohm medida de resistencia)

g: fuerza g

`: Minutos

``: Segundos

[]: Concentración

Resumen

Manipulación de la senescencia de alfalfa (*Medicago sativa* L.) por ingeniería genética

En plantas forrajeras como la alfalfa, la senescencia foliar produce tanto una pérdida de la biomasa de forraje como una reducción de la calidad del mismo. Una estrategia molecular para retrasar la senescencia mediante la ingeniería genética se basa en la expresión de la secuencia codificante de la *isopentenil transferasa* (*ipt*), enzima clave en la biosíntesis de citoquininas. Para lograrlo resulta crítico la utilización de promotores con expresión no constitutiva que permitan la producción sitio-específica y autorregulada de citoquininas. La manipulación de la senescencia constituye un objetivo particularmente atractivo en especies forrajeras.

Se transformaron clones de alfalfa con la construcción AtMYB32-*ipt*, se logró la regeneración de 3 plantas transgénicas, las cuales fueron confirmadas por PCR al amplificar el transgen *ipt*. La expresión del transgen se confirmó por RT-PCR y a través de la técnica de *Southern blot* se observó un patrón de inserción múltiple. También se estableció el patrón de expresión de la construcción AtMYB32-*gus*, la cual se limitó a los tejidos vasculares, con cierta variabilidad de expresión en la parte aérea las plantas. Los fenotipos observados en las plantas AtMYB32-*ipt* fueron desde plantas normales a plantas que perdieron la dominancia apical con raíces necrosadas en su mayoría. Se evaluó la senescencia foliar a través de bioensayos de hojas de plantas que incorporaron el transgen *ipt* y plantas que no lo incorporaron, se observó una senescencia foliar retrasada en plantas transgénicas, se cuantificó dicho retraso a través de los contenidos de clorofila *a* y *b*, proteínas foliares totales y cambios en el perfil de las proteínas foliares en geles SDS-PAGE (subunidad mayor de Rubisco). Se observó a los 35 días un mayor contenido de clorofila *a* y *b*, proteínas foliares y una mayor intensidad de las bandas de la subunidad mayor de Rubisco en las plantas que incorporaron el transgen *ipt*.

Palabras Claves: Senescencia, alfalfa, transformación, *Agrobacterium*, *isopentenil transferasa*, AtMYB32-*ipt*, AtMYB32-*gus*, clorofila, proteínas, Rubisco.

Abstract

Manipulation of the senescence of alfalfa (*Medicago sativa* L.) by genetic engineering

In forage crops like alfalfa, leaf senescence produces both a loss of forage biomass and a reduction in quality. A molecular strategy to slow senescence by genetic engineering is based on the expression of the coding sequence of the *isopentenyl transferase* (*ipt*), a key enzyme in the biosynthesis of cytokinins. The use of non-constitutive expression promoters to allow site-specific and self-regulated production of cytokinins is critical to get this achievement. For these reasons, the manipulation of senescence is a particularly attractive target in forage species.

Alfalfa clones were transformed with the construction of AtMYB32-*ipt*, 3 transgenic plants were regenerated, they were confirmed by PCR amplifying the *ipt* transgene. The transgene expression was confirmed by RT-PCR and a multiple insertion pattern was observed through the *Southern blot* technique. The expression pattern of AtMYB32-*gus* construction was also established, and it was limited to the vascular tissues, with some expression variability in the aerial part of plants.

The phenotypes observed in AtMYB32-*ipt* plants were from normal plants to those that lost apical dominance and mostly with necrotic roots.

Leaf senescence was evaluated through bioassays of leaves from plants that incorporated the *ipt* transgene and plants that did not incorporate it, there was a observed a leaf senescence delay in transgenic plants, the delay was quantified through the contents of chlorophyll a and b, leaf protein totals and changes in leaf protein profile in SDS-PAGE (large subunit of Rubisco). A higher content of chlorophyll *a* and *b* and leaf protein were noted at 35 days and also an increased intensity of the large subunit of Rubisco bands in plants that incorporated the *ipt* transgene.

Key words: Senescence, alfalfa, transformations, *Agrobacterium*, *isopentenyl transferase*, AtMYB32-*ipt*, AtMYB32-*gus*, chlorophyll, protein, Rubisco.

Introducción

1- La alfalfa

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es una planta perenne utilizada como forraje que pertenece a la familia de las leguminosas. Es una especie autotetraploide de fecundación cruzada. Sus raíces suelen ser muy profundas, por lo cual la planta es especialmente resistente a la sequía.

1.1- Origen

El vocablo alfalfa proviene del árabe y significa "el mejor pasto" o "alimento para caballos". Los romanos antiguamente la denominaban medica, de allí su nombre científico *Medicago sativa* L. En Europa (a excepción de España y Portugal), Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda se la denomina comúnmente lucerne.

La alfalfa tiene su área de origen en Asia Menor y sur del Cáucaso que abarca Turquía, Irak, Irán, Siria, Afganistán y Pakistán (Hendry 1923) donde probablemente fue adoptada para el uso por parte del hombre durante la Edad de bronce para alimentar a los caballos procedentes de Asia Central. Los persas la utilizaban como alimento para la caballería del ejército (Itria and Bariggi 1980); ellos fueron quienes alrededor del 490 a.c. introdujeron la alfalfa en Grecia. Recién en el siglo XVI fue introducida en Italia desde España, y desde allí se difundió a toda Europa (Michaud et al. 1988). La llegada al nuevo mundo se produjo en el año 1519, a México. Posteriormente por la ruta del Pacífico, fue trasladada a Perú y Chile. Desde estos países, por vía terrestre, llegó a la Argentina (Tomé 1947).

1.2- Morfología

La alfalfa es una planta herbácea que tiene un porte erecto o semi-erecto, ramificada, y puede alcanzar 1 m de altura.

Semilla: Generalmente de forma arriñonada y color amarillento, se puede encontrar semillas angulares y de coloración que varía desde el verde oliva a distintas tonalidades de marrón. En estado mauro, tiene aproximadamente 1-2 mm de longitud por 1-2 mm de ancho y 1 mm de espesor (figura 1).

En el embrión que originará la futura plántula, se puede observar la radícula, el hipocótilo, la plúmula y los cotiledones.

Raíz: El sistema radicular es robusto y profundo, y su función principal es la absorción de agua. Si no existen impedimentos en el perfil del suelo, la raíz puede alcanzar a los 2 a 5 metros en solo 2 a 4 años de vida, llegando a extraer agua de las capas profundas del suelo, lo cual le ha conferido a la alfalfa su reputación de tolerante a la sequía.

La raíz principal de la planta emerge cerca del hilio y de ella puede o no partir un variado número de raíces secundarias o laterales.

Tallo y Corona: El tallo primario es cuadrado en su sección transversal y presenta estomas y pelos. No sólo tiene crecimiento primario sino que también posee crecimiento secundario que da origen a un eje leñoso o porción perenne, que forma parte de la corona.

A medida que el desarrollo de la planta continúa, el conjunto de la parte basal de tallos nuevos y viejos forma, entre la parte aérea y la raíz, una estructura que recibe el

nombre de corona. Más adelante, en la planta adulta, la corona incluirá la porción perenne de los tallos. En su parte herbácea, presenta nudos desde donde nacen las hojas.

Los tallos son usualmente de consistencia maciza, aunque en algunos casos pueden encontrarse tallos huecos, como el ecotipo argentino *Saladina*.

Además de su constitución morfológica, es conveniente resaltar la importancia funcional de la corona como estructura almacenadora de sustancias de reserva y sede de yemas a partir de las cuales se producirán los nuevos rebrotes de la planta.

Hoja: La primera hoja de la plántula de alfalfa es unifoliolada y de forma orbicular. Las segundas y subsecuentes son pinnaticompuestas o imparipinnadas, y se originan en el ápice del tallo. Posteriormente, cuando la planta ya está desarrollada, las hojas pueden originarse del ápice del tallo o de las yemas laterales ubicadas en los nudos de los tallos.

Las hojas se unen al tallo por el pecíolo y son usualmente trifolioladas, vale decir que se componen de tres folíolos peciolulados (figura 1). Los folíolos son normalmente oblongos u obovados, pero se puede encontrar formas desde redondeadas a obovado-oblongas e incluso lineales.

El borde de los folíolos es dentado usualmente sólo en el tercio superior, aunque también pueden extenderse hasta la mitad superior o incluso en tercio inferior.

Las hojas se disponen a lo largo del eje del tallo en forma alternada. En el nacimiento de las hojas se observan las estípulas, que son unos apéndices delgados a modo de pequeñas hojas modificadas situadas en la base del pecíolo y adheridas a sus lados. Si bien la hoja trifoliolada es la situación normal, se pueden encontrar hojas con 4 (tetrafoliadas), 5 (pentafoliadas) o más folíolos.

Inflorescencia: La flor se desarrolla cuando el ápice del tallo pasa del estado de crecimiento vegetativo al reproductivo. Este cambio (transición), comienza con la aparición de una protuberancia en la axila del primordio foliar, adyacente al ápice del tallo. De cada primordio se origina una inflorescencia en forma de racimo simple.

La flor de la alfalfa es completa y está formada por el cáliz, la corola, los estambres y el gineceo. Es generalmente de color púrpura, con extremos que van desde el violeta claro al morado oscuro. También se pueden encontrar flores blancas, azuladas, amarillas y variegadas (figura 1).

Fruto: Es del tipo legumbre o vaina, monocarpelar, seco e indehisciente, generalmente alargado y comprimido, con las semillas aisladas en la hilera ventral.

La vaina, por encorvamiento, desarrolla una espiral que generalmente posee 1 espira con autofecundación y 3 a 5 vueltas con fecundación cruzada. Cada fruto contiene un número variable de semillas arriñonadas: 2 - 3 con autofecundación y alrededor de 9 semillas con fecundación cruzada (figura 1).

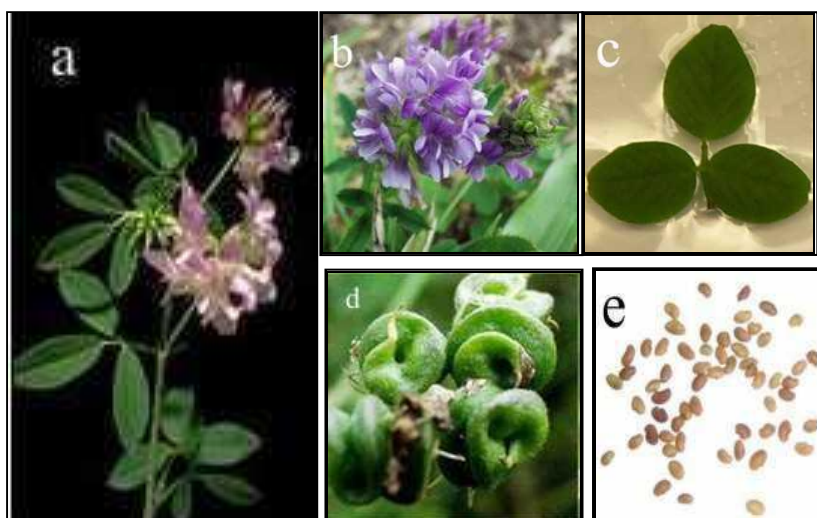


Figura 1- Morfología de la alfalfa. **a)** Tallo erecto, **b)** Inflorescencia, **c)** Hoja trifoliada, **d)** Frutos y **e)** Semillas.

1.3- Importancia económica

La importancia del cultivo de alfalfa se basa en el interés como fuente natural de proteínas, fibra, vitaminas y minerales; así como por su contribución a la sustentabilidad del suelo. Además debe considerarse la fijación simbiótica del nitrógeno para el propio cultivo y para los siguientes en las rotaciones de las que forma parte.

Por ser una especie pratense y perenne, su cultivo limita y reduce la erosión de los suelos y pueden favorecer el control de ciertas plagas y enfermedades en la rotación de cultivos.

La alfalfa, por su adaptación a un amplio rango de condiciones agroclimáticas y por su capacidad de producir elevada cantidad de forraje de alta calidad es una especie utilizada en sistemas de producción de carne y leche en distintas regiones ganaderas templadas del mundo (Racca y col. 2001). La alfalfa es una forrajera irremplazable en los planteos ganaderos extensivos y semi-extensivos en la región pampeana. Es denominada la “reina de las forrajeras”, y las razones que justifican esta denominación son (Ripodas 2003):

Posee una altísima calidad, digestibilidad y palatabilidad.

- Debido a su profundo y eficiente sistema radicular a partir del segundo año puede tolerar condiciones de sequía de manera productiva.
- Por tener la mayor parte de su producción en primavera avanzada y verano, cuenta con un óptimo momento para la henificación, ya que permite un rápido secado de la andana para su posterior enrollado o enfardado.
- Heno de óptima calidad.
- De tres a cuatro años de duración en plena producción.
- Excelente recurso para la terminación o engorde de invernadas cortas.
- Máxima producción de materia seca en mezclas de praderas polifíticas plurianuales.

1.4 - Valor nutricional

La alfalfa es una excelente planta forrajera que proporciona elevados niveles de proteínas, minerales (calcio, fósforo, potasio, magnesio, azufre) y vitaminas (A, B1, B6, C, E y K). Los elevados niveles de β -carotenos (precursores de la vitamina A) influyen en la reproducción de los bovinos. Su valor energético también es muy alto estando relacionado con el valor nitrogenado del forraje. Incrementa el contenido de materia orgánica y de N en el suelo principalmente en los horizontes superficiales, favoreciendo el desarrollo de los cultivos subsecuentes en la rotación (Baldock *et al.* 1981).

En la Tabla 1 se muestra la composición de la materia seca de hojas y tallos de la alfalfa (Bolton 1962).

Tabla 1- Composición nutricional de la materia seca de alfalfa.

Componentes	Hoja %	Tallos %
Proteína bruta	24	10,7
Grasa bruta	3,1	1,3
Extracto no nitrogenado	45,8	37,3
Fibra bruta	16,4	44,4
Cenizas	10,7	6,3

1.5 - La alfalfa en la Argentina

Actualmente la superficie implantada con alfalfa en la Argentina, es de aproximadamente 4 millones de hectáreas (Leonardón y col. 2010). Se producen anualmente 15 millones de toneladas de materia seca (MS) con una producción promedio anual de 9 ton/MS/ha. El 50% está destinado a pastoreo directo y el resto como forraje conservado (rollos o fardos de alfalfa pura o consociada). Surge una clara dimensión del aporte de esta forrajera a nuestra producción pecuaria, si se tienen en cuenta que 10 kg de MS de alfalfa generan 1 kg de peso vivo de novillo o aproximadamente 11 litros de leche (Leonardón y col. 2010). A estos valores se deben agregar la fijación biológica de nitrógeno. De esta manera se puede afirmar que la alfalfa constituye uno de los pilares más destacados de la ganadería argentina (Itria 1986; Hijano y Navarro 1995).

Los primeros materiales de alfalfa utilizados en el país fueron ecotipos (Rossanigo 1992), es decir, poblaciones adaptadas a las condiciones de una región determinada. Esas semillas, en general, eran mezclas de diversas procedencias y calidades, cuyo valor variaba según su aspecto, poder germinativo, contaminación con semillas de malezas, impurezas, etc. Su uso, sin conocimiento acerca de sus características genéticas determinó, junto con la aparición en el país de plagas como los pulgones, el decaimiento paulatino de los alfalfares (Rossanigo 1992).

De acuerdo al origen se diferencian tres tipos de ecotipos:

Ecotipo pampeano: proveniente de la región pampeana bonaerense, de baja tasa de crecimiento otoño-invernal, con plantas de coronas amplias y folíolos pequeños.

Ecotipo cordobés: originario del centro de la provincia de Córdoba. Posee un crecimiento invernal intermedio, con mayor tasa de crecimiento que el anterior. Presenta coronas menos desarrolladas y un hábito semi-erecto. Tiene excelente capacidad de producción de semilla.

Alfalfas invernizas: también conocidas como "alfalfas de caña hueca". Son originarias de las regiones de riego, con menor reposo invernal que el ecotipo cordobés y frecuentemente utilizadas para corte. Las coronas de las plantas son de tamaño pequeño y su hábito de crecimiento es erecto.

La principal área sembrada con alfalfa en la Argentina está delimitada por los paralelos 30° y 40° S y los meridianos 58° y 65° W, existiendo otras áreas de menor importancia, como las regiones de riego del Noroeste, Cuyo y Patagónica y la región Chaqueña (entre los 22° y 55° S y los 58° y 68° W). Esta extensa distribución norte-sur implica un amplio rango de adaptación a diversas condiciones ambientales (Rodríguez y col. 1986; INDEC 2002) (Tabla 2).

La Región Pampeana es la principal área de producción de la alfalfa (90%), que comprende el noroeste de La Pampa y Buenos Aires, el centro-sur de Santa Fe y el sudeste de Córdoba (tabla 2; Collino y col. 2007). Dicha región posee ambientes favorables para esta forrajera que se cultiva casi exclusivamente en condiciones de secano, con rendimientos anuales de forraje elevados, estables y muy buenos niveles de persistencia (4-5 años).

Tabla 2- Superficie (en miles de hectáreas) cultivada con alfalfa pura, alfalfa consociada con otras forrajeras, y total de pasturas en la Región Pampeana. Adaptado de INDEC 2002.

Provincia / Región	Alfalfa pura	Alfalfa coasociada	Total forrajeras
Buenos Aires	114	1.909	4.513
Córdoba	1.015	316	1.793
Entre Ríos	54	97	391
La Pampa	222	431	1.000
Santa Fe	345	479	947
Total Región	1.750	3.232	8.643

Finalmente, cabe destacar que en la República Argentina durante los últimos 20 años, como consecuencia del mejoramiento genético y la aplicación de nuevas tecnologías de establecimiento y manejo, se ha incrementado la producción de forraje de las alfalfas en no menos de un 40% (Romero 2003).

2- Transformación genética de plantas

El mejoramiento de importantes cultivos agrícolas ha sido una preocupación constante desde el origen de la agricultura, la cual se basó desde sus comienzos, en el mejoramiento vegetal realizado por prueba y error. Se seleccionaba sobre la base de un aspecto sanitario, crecimiento vigoroso, mayor rendimiento y mejor apariencia, sabor y aroma de las porciones comestibles. Con el desenvolvimiento de sistemas eficientes de transformación y regeneración de plantas, se han creado nuevas posibilidades para el mejoramiento vegetal. Con el conocimiento de las bases moleculares y los mecanismos bioquímicos que regulan características agronómicas importantes, ha sido posible definir estrategias adicionales para el mejoramiento de plantas por medio de la introducción e integración estable de uno o más genes clonados de las células vegetales.

En los últimos 20 años, la aplicación de las herramientas de biología molecular permitió la producción de plantas y animales con nuevas características, las que no podrían haber sido introducidas por las técnicas de mejoramiento tradicional.

La práctica habitual para obtener individuos portadores de la característica deseada, ha sido efectuar cruzamientos entre individuos de la misma especie o especies próximas. En este contexto la incompatibilidad sexual entre las especies es una importante limitación. La Ingeniería Genética permite el acceso y manipulación directa de los genes rompiendo las barreras impuestas por la sexualidad. Esta tecnología nos permite no sólo introducir en una planta genes procedentes de otras especies vegetales sino también de animales y microorganismos. Estos genes se pueden transferir por técnicas no sexuales obteniendo plantas transgénicas, es decir, portadoras de un gen manipulado que se denomina transgen.

Dado que las células tienen diferente competencia o capacidad de respuesta para cada uno de estos procesos, la puesta a punto de un protocolo de transformación eficiente requiere maximizar la cantidad de células competentes para todos ellos de manera simultánea (Díaz y col. 2004).

La obtención de un organismo transgénico implica básicamente, cinco etapas de trabajo:

- Identificación del gen que codifica para la característica de interés.
- Clonado del gen de interés.
- Modificación del gen para un correcto funcionamiento en el organismo receptor.
- Transferencia del gen al organismo al cual se desea modificar.
- Caracterización del organismo transformado incluyendo la expresión del transgen.

2.1- Identificación del gen

El mayor impedimento del uso de la ingeniería genética en el mejoramiento de plantas, se refiere al número limitado de genes determinantes de características importantes desde el punto de vista agrícola que han sido identificados y localizados.

Aun a pesar del importante desarrollo de proyectos genómicos en plantas es relativamente poco lo que se sabe acerca de los genes específicos necesarios para aumentar el potencial de rendimiento, mejorar la tolerancia a los factores desfavorables, etc.

En general, no basta identificar a un solo gen relacionado con una característica; es necesario conocer cómo está regulado el gen, qué otros efectos podría tener en la planta y cómo podría interactuar con otros genes activos en la misma vía metabólica.

2.2- Clonado

Una vez localizado un gen de interés, el siguiente paso es clonarlo. La clonación de un gen implica la introducción del mismo en una molécula de ADN circular llamada vector de clonación con el fin de producir una molécula de ADN recombinante (Figura 2). Esta a su vez es introducida en una célula hospedante (generalmente *E. coli*) mediante algún método de transformación de células como puede ser la electroporación.

Durante la división celular se produce la replicación del vector con lo cual de una célula se obtendrá un clon y con ello una muestra pura de un gen específico.

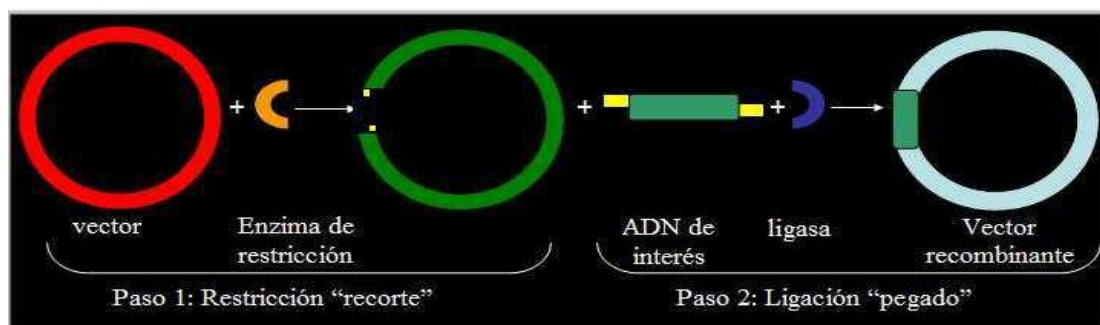


Figura 2- Esquema simplificado de los pasos en la construcción de vectores recombinantes.

Un plásmido es un fragmento de ADN circular extra cromosómico que suele contener información no vital para la bacteria y cuyo tamaño es del orden del 1 al 3% del cromosoma bacteriano. Son moléculas de fácil purificación. Otra característica es que poseen genes de resistencia a antibióticos. La presencia de estos genes significa que una bacteria transformada puede crecer en un medio que contiene el antibiótico en cuestión, a diferencia de las células que no poseen el plásmido. Por último, poseen un alto número de copias.

Para el clonado se utilizan enzimas de restricción y ligasas. Las enzimas de restricción son endonucleasas que reconocen una secuencia de nucleótidos específica (4 a 8) e hidrolizan las uniones fosfodiésteres de la doble hélice cortando la molécula de ADN en el lugar de reconocimiento. El corte puede generar extremos cohesivos o romos.

Las ligasas tanto *in vivo* como *in vitro*, catalizan enlaces fosfodiéster entre nucleótidos adyacentes. Las uniones pueden ser tanto de extremos cohesivos como romos. En el primer caso la ligación es relativamente eficiente porque el rellenado de bases está dirigido por la secuencia de extremo cohesivo. Mientras que en los extremos romos la enzima realiza asociaciones de pares de bases al azar.

2.3- Construcción del vector

El transgen antes de que pueda ser efectivamente insertado en una planta debe ser sometido a varias modificaciones. En primer lugar, es preciso incluir una secuencia promotora (P) para que la secuencia codificante sea expresada correctamente.

El promotor es la llave de encendido y apagado que controla cuándo y dónde se expresará el gen en la planta. Los promotores pueden ser "constitutivos", es decir, que producen la expresión del gen durante todo el ciclo biológico de la planta en la mayoría de los tejidos. El promotor constitutivo más comúnmente usado es CaMV35S, proveniente del virus del mosaico del coliflor, que generalmente produce un alto grado de expresión en las plantas.

Otros promotores son más específicos y responden a señales indicadoras en el medio interno o externo de la planta. Son llamados "inducibles", un ejemplo de estos es el promotor del gen "cab", que codifica la principal proteína unida a clorofilas *a* y *b* y es inducido por la luz, al igual que el gen de la subunidad pequeña de la rubisco. Por último existe un tercer tipo de promotores "específicos de un tejido" que permiten la transcripción en determinados órganos y tejidos. La elección del promotor se efectúa según el organismo que se desea transformar ya que puede variar su actividad.

La secuencia de terminación de la transcripción (T) indica a la maquinaria celular que se ha alcanzado el final de la secuencia génica. Por ello es imprescindible que se incluya en el transgen una región no traducida en el extremo 3' que incluya la señal de corte y poliadenilación, sin la cual no se produciría el correcto procesamiento del transcripto.

Finalmente se incluye un gen marcador seleccionable a la construcción, con el fin de identificar las células o tejidos de la planta que han integrado con éxito el transgen. Esto es necesario porque la incorporación y expresión de transgenes en células de plantas, se logra en apenas un pequeño número de células de los tejidos transformados.

Los genes marcadores seleccionables codifican proteínas que proporcionan resistencia a agentes normalmente tóxicos para las plantas, como los antibióticos o herbicidas. Sólo las células vegetales que han integrado el gen marcador seleccionable sobrevivirán cuando se las cultive en un medio que contenga el antibiótico o herbicida pertinente. En cuanto a otros genes insertados, los genes marcadores también requieren secuencias promotoras y de terminación para funcionar en forma apropiada.

2.4- Métodos de transformación

El transgen es un cambio heredable en una célula u organismo, producido por la incorporación del ADN transferido al ADN cromosómico. Existen métodos físicos y biológicos para transformar las células y tejidos de las plantas:

- **Bombardeo con microproyectiles o biolística:** Esta técnica, ha sido especialmente útil en la transformación de especies de monocotiledóneas como el maíz y el arroz.
- ***Agrobacterium*:** Este método ha sido practicado con éxito en dicotiledóneas durante muchos años, pero sólo recientemente ha sido utilizada en monocotiledóneas. En general, se prefiere el método con *Agrobacterium* porque es mayor la frecuencia de inserciones de copia única de los transgenes, lo cual favorece la correcta expresión de los mismos. Se aplicó con éxito por primera vez en 1984 en tabaco (Horsch *et al.* 1984, De Block *et al.* 1984).

2.4.1- Transformación de plantas con *Agrobacterium*

Las agrobacterias son microorganismos aeróbicos que habitan típicamente en el suelo. Son bacilos Gram-negativos, que no forman esporas.

El género *Agrobacterium* pertenece a la familia *Rhizobiaceae*, esta subdividido en 5 especies que difieren entre sí por la patogenicidad y el modo de infección en diferentes plantas. Las más representativas son *A. tumefaciens*, agente etiológico de la enfermedad conocida como “agalla de la corona” (Figura 3); *A. rhizogenes* que induce “raíz en cabellera” (Figura 3) y *A. radiobacter* representante saprofita. *A. tumefaciens* infecta a la mayoría de las plantas dicotiledóneas y a algunas monocotiledóneas y gimnospermas, produciendo tumores (producción en masa de células desdiferenciadas)

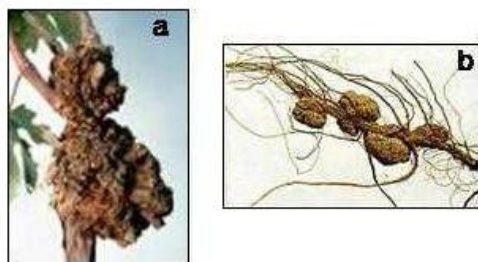


Figura 3- Agallas producidas por **a)** *A. tumefaciens*, **b)** *A. rhizogenes*.

La secuenciación del genoma de una cepa de *A. tumefaciens*, la C58 (Goodner *et al.* 2001; Wood *et al.* 2001), indica que está compuesto por cuatro replicones: un cromosoma lineal (2.075,56 Kb), un cromosoma circular (2.841,49 Kb) y dos plásmidos: el plásmido Ti (del inglés “*Tumour inducing*”) pTiC58 (214,233 Kb), portador del ADN-T y otro plásmido: pAtC58 (542,779 Kb) que tiene un efecto positivo en la inducción de genes *vir* y puede conjugarse con otras bacterias en caso de ausencia del plásmido pTiC58 (Figura 4). Ambos plásmidos contienen toda la maquinaria necesaria para la conjugación y no contienen genes esenciales. En los dos cromosomas están presentes todos los genes que codifican para ARN estables (tARNs y rARNs) y proteínas de mantenimiento que están involucradas en las funciones celulares esenciales y el crecimiento prototrófico.

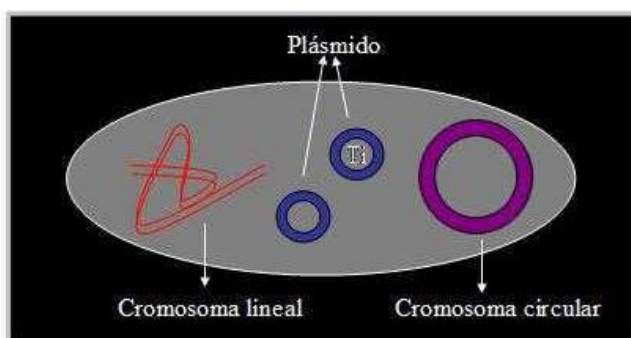


Figura 4- Diagrama de la célula de *A. tumefaciens*.

2.4.1.1- Aspectos moleculares de la infección de *A. tumefaciens*

El método de transformación de plantas mediante el uso de *A. tumefaciens* se basa en el mecanismo natural de infección de la misma, durante el cual la bacteria transfiere a la planta un segmento de ADN del plásmido Ti (llamado ADN de transferencia, ADN-T) (Figura 5). Cuando el ADN bacteriano se integra en un cromosoma de la planta, se apodera literalmente, de la maquinaria celular de ésta y la usa para asegurar la proliferación de la población bacteriana provocándole un tumor o agalla.

Existen varios genes en el cromosoma de *Agrobacterium* que afectan a la virulencia, relacionados con síntesis de proteínas de pared (glucanos, fibrillas de celulosa), que tienen un papel más general en las interacciones bacteria-planta. Los genes cromosómicos *chv A*, *chv B*, *chv E*, *cel*, *psc A* y *att* están involucrados en la unión de *A. tumefaciens* a la célula vegetal y la colonización bacteriana.



Figura 5- Esquema del plásmido Ti.

Este plásmido contiene dos regiones esenciales para la movilización e integración del ADN-T en las células vegetales, una corresponde a ambos extremos del ADN-T, borde izquierdo y borde derecho (BI y BD, llamadas LB y RB por sus siglas en inglés) que consisten en una repetición directa casi perfecta de 25pb (5'TGACAGGATA-TATTGGCGGGTAAAC3') y la otra es la llamada región *Vir* (virulencia) que se requiere para que la escisión, transferencia e integración del ADN-T sean efectivas.

Además de la función de virulencia el plásmido Ti posee otras funciones, tales como: oncogénica (Onc), responsable del tumor; de síntesis de opinas (Ops), moléculas que sirven de alimento a la propia bacteria y la función catabolismo de opinas (Opc,). Existen varios segmentos Opc1, Opc2, que permiten la degradación de las opinas producidas por el tumor.

El mecanismo de transferencia del ADN-T a la célula vegetal está determinado por la interacción molecular entre la bacteria y la planta. Se describen siete eventos fundamentales para la interacción *A. tumefaciens*-planta: (1) reconocimiento y adherencia; (2) identificación de señales de la planta; (3) activación de genes *vir*; (4) generación del ADN-T; (5) exportación del ADN-T hacia la planta; (6) importación del ADN-T dentro del núcleo de la planta; (7) integración del ADN-T dentro del genoma del hospedador (Tzfira *et al.* 2004).

2.4.1.2- Utilización de genes marcadores seleccionables y reporteros

La introducción de un gen en una célula le confiere una nueva característica. Si ésta selecciona a la célula transformada permitiendo que solo ella sobreviva, se dice que el gen es un gen marcador seleccionable, si por el contrario, permite identificar una célula se lo llama gen reportero. En uno u otro caso, la característica introducida debe ser fácilmente distinguible de cualquier actividad endógena de la planta (Herrera-Estrella *et al.* 1983).

Los genes marcadores seleccionables más utilizados actualmente son los que confieren resistencia a antibióticos o herbicidas. Dentro de los mismos se conocen dos clases generales: los que producen un sustrato funcional que no es reconocido por el agente selectivo, y los que dan un producto que permite la desintoxicación por

inactivación o degradación del agente selectivo (De Block *et al.* 1987), siendo estos últimos los más utilizados (Schrott 1995).

Como ejemplo de gen marcador seleccionable se puede nombrar el gen *neo* (Bevan *et al.* 1983) aislado de *E. coli*, y que codifica para la enzima fosfotransferasa II (*nptII*). Ésta actúa detoxificando a la kanamicina por fosforilación de la misma. La kanamicina se une a las subunidades 30S y 50S de los ribosomas tanto en bacterias como en mitocondrias vegetales y cloroplastos, inhibiendo la iniciación de la traducción (Davies 1988). El resultado en plantas se manifiesta con clorosis e inhibición del crecimiento del tejido vegetal (Weide *et al.* 1989). Este es uno de los marcadores de selección más utilizado en transformación de plantas.

La secuencia codificante de un gen reportero es frecuentemente utilizada en plantas transgénicas donde se desea evaluar por ejemplo, la capacidad de un promotor de controlar la expresión del gen. Estos genes también son útiles si se desea evaluar un protocolo de transformación de plantas. El gen GUS (*gusA*, *uidA*) fue aislado de *E. coli* (Jefferson *et al.* 1987), es el más utilizado actualmente por su simplicidad, rapidez y versatilidad de los métodos de detección de la actividad enzimática y además porque la mayoría de las plantas no presentan actividad endógena significativa. El gen codifica para la β -glucoronidasa (GUS), es una hidrolasa que cataliza el clivaje de una gran variedad de β -glucoronídeos, disponible comercialmente como sustrato espectrofotométrico, fluorimétrico e histoquímico.

La β -glucoronidasa es una hidrolasa, cuya forma activa es probablemente un tetramero. La β -glucoronidasa presenta limitaciones, debido a que los ensayos son destructivos al contrario de la *green fluorescent protein* (GFP) o de la antocianina, que pueden ser detectadas *in vivo*.

La presencia o ausencia de GUS puede ser detectada mediante pruebas histoquímicas, fluorométricas y espectrofotométricas.

- Prueba histoquímica: utilizando el sustrato cromogénico X-Glu (5-bromo-4-cloro-3-indolglucoronico), en presencia de la enzima β -glucoronidasa, forma un precipitado color azul índigo, como resultando de la dimerización del producto de la hidrólisis del X-Glu.
- Prueba fluorométrica: la actividad GUS se puede detectar mediante el uso de sustratos fluorogénicos, como el 4-metil umbeliferil glucoronico (MUG). Este compuesto no es fluorescente, pero al ser clivado por la β -glucoronidasa, produce 4-metil umbeliferona (4-MU) que fluoresce en valores altos de pH alcalino.
- Prueba espectrofotométrica: la actividad enzimática GUS puede ser cuantificada espectrofotométricamente. El sustrato utilizado es el p-nitrofenil- β -D-glucoronico (PNPG), cuyo producto de la reacción, presenta un color amarillo en pH alcalino (Jefferson *et al.* 1987).

Un mismo gen puede servir como marcador de selección y reportero, dependiendo de cómo se lo emplee.

2.5- Cultivo *in vitro*

Las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales permite obtener una planta entera a partir de células vivas en condiciones controladas de cultivo. El fenómeno de la totipotencialidad celular permite la desdiferenciación previa de la célula inicial,

induciendo la pérdida de sus características especializadas hasta alcanzar un estadio de desdiferenciación meristemática. Posteriormente, se obtiene la rediferenciación de esta célula de partida, de manera de lograr variadas respuestas morfogénicas, tales como la obtención de callo, la regeneración de brotes o primordios de raíz, etc. Para promover estas posibles respuestas, es necesario adicionar a los medios sintéticos de cultivo reguladores del crecimiento, fundamentalmente auxinas y citoquininas (Sharp *et al.* 1982).

Los primeros experimentos en la temática del cultivo *in vitro* de plantas se llevaron a cabo a comienzos del siglo XX. Así, Robbins (1922) inició el cultivo aislado de meristemas, desarrollando esta técnica a partir de ápices de raíz. Más tarde White (1934) logró el cultivo indefinido de raíces *in vitro*. Con el descubrimiento de las primeras hormonas vegetales, resultó posible promover la desdiferenciación de tejidos vegetales y obtener variadas respuestas morfogénicas (Went and Tinman 1937).

Para el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales, es de suma importancia el estado fisiológico de las plantas donantes, a partir de las cuales se tomarán los explantos, bajo condiciones controladas de asepsia, nutrientes, luz y temperatura.

La disección de los explantos y los subcultivos sucesivos se realizan bajo condiciones de esterilidad en un gabinete de flujo laminar. Dichos explantos se cultivan en cámara de crecimiento en condiciones controladas de temperatura y fotoperiodo.

El cultivo de tejidos vegetales requiere de un medio nutritivo básicamente consistente en sales inorgánicas, una fuente de carbono, algunas vitaminas, reguladores del crecimiento y suplementos orgánicos (Tabla 3).

Tabla 3- Componentes para medios de cultivo.

Compuestos inorgánicos	Micronutrientes: Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mo^{2+} , Co^{2+} , I
	Macronutrientes : NO_4^- , PO_4^{3-} , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , SO_4^{2-}
Carbohidratos	Sacarosa, glucosa, mio-inositol
Vitaminas	Tiamina (B1), piridoxina, Acido nicotínico (C), biotina
Reguladores del crecimiento	Auxinas, citoquininas, giberelinas
Aminoácidos	Glicina

Los hidratos de carbono constituyen una fuente de energía y las vitaminas actúan como catalizadores de reacciones enzimáticas (Thorpe 1981). Los reguladores de crecimiento actúan a bajas concentraciones, están involucrados en numerosos procesos fisiológicos e interactúan unos con otros, siendo los resultados determinados por las concentraciones relativas entre las diferentes fitohormonas. El suplemento de auxinas y citoquininas resulta fundamental para la regulación de la división celular, el alargamiento y la diferenciación de las células en cultivo y la formación de órganos *de novo* u organogénesis. El manejo de diferentes concentraciones relativas de estos reguladores del crecimiento determina las respuestas morfogénicas.

Los medios de cultivo *in vitro* pueden ser líquidos o semisólidos con las adición de un agente gelificante inerte.

El pH de los medios de cultivo determina la disponibilidad de los compuestos osmóticos y regula un amplio rango de reacciones bioquímicas que tienen lugar en las

células vegetales en cultivo. Debe tenerse siempre en cuenta la posible modificación del valor de pH luego de la esterilización de los medios en la autoclave. Otras causas de modificación del valor del pH son el tipo de hidrato de carbono adicionado, el agente gelificante y el uso de carbón activado (Doods and Roberts 1995).

Existe una gran variedad de formulaciones de medios de cultivo en la literatura. La elección de una u otra formulación dependerá del objetivo y la aplicación particular de la técnica del cultivo de tejidos implementada y de la especie o tipo de planta en cuestión. Los requerimientos nutricionales básicos del material vegetal cultivado son similares a los de una planta a campo. Medios como el MS (Murashige and Skoog, 1962) y SH (Schenk and Hildebrandt, 1972), presentan una alta concentración de macronutrientes.

Existen dos posibles vías morfogenéticas para la diferenciación *de novo* de brotes o plantas enteras: la *organogénesis* y la *embriogénesis somática*. Los factores involucrados en una u otra vía son: la edad de la planta madre dadora de explantos, el tipo de explanto, el medio de cultivo, los reguladores del crecimiento y las condiciones artificiales de cultivo.

La organogénesis está químicamente regulada por la relación auxinas/citoquininas. Existen también otros factores involucrados. Entre estos, se cuentan otros reguladores del crecimiento, tales como las giberelinas (que suprimen la iniciación de brotes o raíces) y la formación endógena de etileno (que bloquea la iniciación de la organogénesis, pero promueve el crecimiento y diferenciación de los primordios de yemas o raíces preexistentes).

Por otro lado, los factores químicos más importantes involucrados en la vía embriogénica son las auxinas y los compuestos nitrogenados reducidos ($[\text{NH}_4]^+$, urea, ácido glutámico, glutamina). El suplemento de los medios de cultivo con carbón activado promueve, en algunos casos, la embriogénesis. Por lo general, se requieren dos medios de cultivo diferentes para promover la embriogénesis somática: un medio de iniciación de las células embriogénicas, conteniendo auxinas, y un segundo medio para la diferenciación de los embrioides, sin agregado de auxinas o con un nivel reducido de este tipo de compuestos (Doods and Roberts 1995). La embriogénesis se presume de origen unicelular. Da lugar a estructuras bipolares que no presentan conexión vascular con el explanto a partir del cual se han diferenciado. El proceso ocurre en dos etapas: en la primera fase, células competentes aisladas en medios ricos en auxinas forman grupos de células embriogénicas (centros embriogénicos). En la fase dos, una vez repicados los centros embriogénicos a un medio sin auxinas, estos proliferan de forma lenta e indiferenciada. Luego se producen una serie de rápidas y sucesivas divisiones celulares en distintas zonas del centro embriogénico y se conforman embriones globulares, que al crecer pasan por los estados de corazón y torpedo. Tras una fase de maduración y germinación los embriones somáticos, ya desdiferenciados, pueden ser separados del resto del explanto de manera de obtener plantas clonales completas (con meristema del vástago y meristema de la raíz). Estas plantas responderán al genotipo y características varietales de la planta madre. Dado el origen unicelular de la estructura *de novo*, la posibilidad de obtener plantas quiméricas es prácticamente nula por esta vía de regeneración.

Una vez establecido el cultivo *in vitro*, pueden esperarse diferentes respuestas que van desde la aparición de brotes o embriones somáticos desarrollados directamente a partir del explanto inicial, a la regeneración indirecta a partir de la formación de callo por proliferación de las células desdiferenciadas. Partiendo de diferentes explantos

iniciales (disco de hoja, suspensión celular, meristema, estaca uninodal, entre otros), es posible promover una u otra vía en función de la composición del medio de cultivo, el balance de reguladores, las condiciones físicas del cultivo y la especie en cuestión.

La vía indirecta presupone la desdiferenciación total del explanto, seguida de sucesivas divisiones mitóticas desordenadas que dan lugar a la proliferación de una masa amorfa de células indiferenciadas denominada callo. La regeneración directa implica la aparición de estructuras *de novo*, ya se trate de primordios de yemas o raíces adventicias, a partir de células individuales o grupos de células parcialmente desdiferenciados en el explanto. En este caso no existe proliferación masiva de células desdiferenciadas con potencialidad meristemática.

En el año 1984 se iniciaron en el Instituto de Genética "Ewald A. Favret" (IGEAF) investigaciones en biotecnología de alfalfa. Debido a que las técnicas de transferencia de genes se basan en la selección *in vitro* de células transformadas y la regeneración de plantas a partir de ellas, para su aplicación es necesario disponer de genotipos con alta capacidad de regeneración *in vitro*. Por ello, se exploró la respuesta *in vitro* de germoplasma local observándose muy baja regeneración. Dicho resultado llevó al estudio del control genético del carácter. Se determinó, en coincidencia con otros trabajos, que el carácter regeneración *in vitro* está controlado por 2 genes complementarios (Robredo y col. 1993; Rios y col. 1994; Moltrasio *et al.* 2004).

La transformación genética de alfalfa a través de *A. tumefaciens* ha sido lograda por varios grupos de investigación (Shahin *et al.* 1986; Chabaud *et al.* 1988; D'Halluin *et al.* 1990; Hill *et al.* 1991; Bagga *et al.* 1992; McKersie *et al.* 1993; Du *et al.* 1994; Thomas *et al.* 1994).

A fines de 1992 se comenzó en el IGEAF con el desarrollo de tecnología de transformación genética de esta especie. Dada la necesidad de disponer de material vegetal con alta regeneración *in vitro* y buena adaptación a las condiciones locales, se realizó la introgresión de alelos favorables para la regeneración *in vitro* a germoplasma adaptado a las condiciones de Argentina. Para ello, se realizaron cruzamientos entre clones de alta regeneración desarrollados en el IGEAF y materiales del Programa de Mejoramiento Genético del INTA. A partir de ellos se obtuvieron 9 clones con capacidad de regeneración *in vitro* y mejor adaptación a las condiciones locales. Cabe mencionar que 2 de los mismos (431-5/11 y 432-19/17) presentaron una elevada capacidad de regeneración y multiplicidad, equivalentes a las observadas en los "genotipos modelo" (Moltrasio *et al.* 2004).

Asimismo, se desarrolló un protocolo eficiente de transferencia de genes mediada por *A. tumefaciens*. El mismo consiste en la inoculación de pecíolos o embriones somáticos con la bacteria, co-cultivo y posterior cultivo *in vitro* en medio selectivo. Como marcador seleccionable se utiliza el gen *nptII* y como agente selectivo el antibiótico kanamicina. El desarrollo de una metodología eficiente de transformación genética vía *A. tumefaciens* permitió, posteriormente en el IGEAF, la obtención de plantas transgénicas en diversos proyectos dirigidos a la solución de aspectos básicos y aplicados (Rios y col. 2007; Ardila *et al.* 2005; Chiesa, *et al.* 2007; Ferri y col. 2005; Ferri, *et al.* 2007; Insani y col. 2005; Nahirñak 2008; Dus Santos *et al.* 2005; Mozgovoj *et al.* 2007; Wigdorovitz *et al.* 2004).

2.6- Análisis molecular del material transgénico

2.6.1- Detección de transgenes por PCR

La evaluación de la presencia del transgen en un organismo transgénico se lleva a cabo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR = *Polymerase Chain Reaction*). Este sistema permite amplificar más de un millón de veces un fragmento de ADN obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos. Esta técnica fue descrita por Mullis *et al.* en 1986 (Ver Anexo A 3.11 p185y 3.12 p187).

Para la PCR se utilizan dos oligonucleótidos sintéticos compuestos por unos 15-20 nucleótidos que son complementarios a las zonas flanqueantes de la región que se quiere amplificar. Estos oligonucleótidos (habitualmente conocidos por su nombre en inglés, *primers*) actúan como cebadores para la síntesis *in vitro* de ADN la cual está habitualmente catalizada por una enzima llamada *Taq polimerasa*. Dicha enzima se aísla de una bacteria termófila, denominada *Thermus Aquaticus*, que es capaz de crecer a temperaturas elevadas (79 - 85 ° C). A esta temperatura, dicha enzima es capaz de mantener una media de extensión de más de 60 nucleótidos por segundo en regiones ricas en uniones G-C. La temperatura óptima a la que actúa la *Taq polimerasa* permite el uso de elevadas temperaturas para la unión de los *primers* y para la extensión, de esta manera se aumenta el nivel de exigencia de la reacción y se reduce la extensión de los *primers* unidos inespecíficamente al ADN.

2.6.2- Comprobación de la integridad del transgen

El uso de varios pares de *primers* que hibriden en diferentes zonas del transgen, permite inferir si este está íntegro o por el contrario carece de alguna secuencia.

2.6.3- Detección de la transcripción del transgen

La comprobación de que un gen fue transcrito es posible si se identifica ARNm correspondiente a dicho gen. Esto se logra con la técnica de RT-PCR, que permite la formación de ADN a partir de ARN. Es un tipo de PCR donde el molde inicial es ARN y se requiere de una transcriptasa inversa, para realizar la conversión del ARN a un tipo de ADN complementario llamado ADNc. La transcriptasa inversa o retrotranscriptasa es una enzima de tipo ADN-polimerasa (ADN polimerasa/ARN dirigida), que tiene como función sintetizar ADN utilizando como molde ARN monocatenario, es decir, catalizar la transcripción inversa. Esta enzima se encuentra presente en los retrovirus. El ADNc servirá de molde para una nueva PCR.

La amplificación exponencial de la secuencia complementaria del ARNm o las secuencias del ARN vía la reacción en cadena reversa de la polimerasa de la transcripción permite una técnica de la detección de alta sensibilidad, donde puede ser detectado un número bajo de copias o las moléculas menos abundantes del ARN.

2.6.4- Análisis de la integración del ADN mediante la técnica de *Southern Blot*

El método *Southern blot* fue desarrollado por E. M. Southern para la detección de genes específicos en el ADN (Ver Anexo A 3.13 p188).

En condiciones apropiadas la sonda formará puentes de hidrógeno (hibridará) con una secuencia complementaria a ella si se encuentra presente en la muestra, formando una molécula de doble cadena. Por lo tanto, la presencia de la secuencia de

interés se pone de manifiesto gracias a la sonda hibridada. Si la secuencia complementaria no se encuentra en dicha muestra, la sonda no hibridará. Si se eligen las enzimas de restricción adecuadas se podrá visualizar el número de copias del transgen, hecho relevante para el análisis individual de cada evento de transformación.

Las sondas empleadas en experimentos de hibridación son de largo variable, desde cortos oligonucleótidos de 15 a 30 bases de largo, hasta cadenas de miles de bases. Las sondas se marcan radiactivamente por varios métodos. Algunos consisten en sintetizar la sonda en presencia de un nucleótido radioactivo (p.e. ^{32}P -dCTP), otros en la unión de un fosfato radioactivo terminal por acción de la enzima polinucleótido quinasa.

Existen métodos para marcar no radioactivos que consisten en nucleótidos con modificaciones químicas que resultan en un producto coloreado o luminiscente luego de una reacción de detección.

3- Senescencia de las plantas

La senescencia ocurre en todas las plantas en todos los estados de desarrollo (Tabla 4). El ciclo de vida de una planta pasa por las etapas sucesivas de crecimiento, floración, envejecimiento y muerte. No obstante, existen diferentes tipos de senescencia, dependiendo del ciclo vital de la planta. En plantas de ciclo anual, entre las cuales se encuentra la mayoría de las herbáceas, la planta entera muere después de la formación de las semillas y los frutos; la senescencia en estas plantas es monocárpica. Por el contrario, en plantas de ciclo plurianual, la formación de flores y frutos no conducen al envejecimiento de toda la planta, sin embargo, diversas partes de estas plantas, como las hojas, las flores y los frutos, tiene un período de vida limitado y atraviesan un proceso de senescencia; la senescencia en estas plantas es policárpica. (Azcón Bieto y Talón 2000).

Tabla 4- Proceso de senescencia en diferentes estados de desarrollo de la planta.

Estado de desarrollo	Proceso de senescencia
Plántula	Senescencia de cotiledones
	Senescencia en la diferenciación de traquéidas y tubos cribosos
	Senescencia de los pelos radiculares y células del ápice radicular
Vegetativo	Senescencia en la diferenciación y el recambio celular
	Senescencia foliar, secuencial o sincrónica
	Senescencia en el desarrollo de espinas y púas
	Senescencia en el proceso de abscisión
Floración	Senescencia y abscisión de partes florales
	Continuación de muchos procesos de senescencia de tejidos vegetativos
Fructificación	Senescencia de toda la planta (monocárpica)
	Senescencia de tallos aéreos
	Senescencia y dehiscencia de frutos secos
	Senescencia y abscisión de frutos carnosos

3.1- Senescencia foliar

La senescencia es el último estadio en el desarrollo ontogénico de una hoja, generalmente se define a la senescencia como un proceso de dismantelamiento celular, que finaliza con la muerte de células, tejidos u órganos. Dicho proceso puede ser dividido en dos etapas: un período inicial de redistribución de nutrientes que implica principalmente la degradación de los cloroplastos y la exportación de nitrógeno y otros

nutrientes liberados hacia otros órganos y un período final de muerte celular una vez que la redistribución de nutrientes ha sido completada (Guiamet 2003).

Desde el punto de vista funcional, la senescencia foliar no es solo un proceso degradativo, sino también un proceso de reciclaje en el que los nutrientes son transportados desde las células que envejecen a las hojas jóvenes, las semillas en desarrollo y los tejidos de reserva. Por otra parte, hay que considerarlo como un proceso reversible ya que las hojas pueden reverdecer aún después que han perdido el 90% de la clorofila y proteínas (Zavaleta-Mancera *et al.* 1999).

El síntoma inicial y distintivo de la senescencia foliar es la degradación de los cloroplastos. Tras la dilucidación de la vía de degradación de clorofila (Thomas *et al.* 2001), el principal enigma en este campo es el mecanismo de dismantelamiento de los cloroplastos y degradación de las proteínas. Aunque por su abundancia parecerían un objeto sencillo de estudio, se desconoce casi por completo el mecanismo involucrado en la degradación de proteínas cloroplásticas durante la senescencia. Los esfuerzos de investigación se han orientado a la búsqueda de enzimas hidrolíticas (fundamentalmente proteasas) localizadas en los plástidos y expresadas preferencial o específicamente durante la senescencia. Sin embargo, estudios de fraccionamiento subcelular muestran que la mayor parte de la actividad proteolítica en las células senescentes reside en la vacuola. Los numerosos estudios sobre cambios en la expresión génica han arrojado una larga lista de proteasas, en gran parte proteasas cisteínicas, cuya expresión (niveles de ARNm) aumenta durante la senescencia; paradójicamente, algunas de estas proteasas son enzimas vacuolares o extracelulares, muchas otras tienen una localización desconocida, y solamente unas pocas residen en el cloroplasto (Gepstein *et al.* 2003). Sin trabajos donde se manipule la expresión de las proteasas asociadas a la senescencia es difícil establecer sus funciones, pero la abundancia de proteasas no cloroplásticas y de proteasas de procesamiento vacuolar sugiere que al menos parte de la degradación de proteínas podría ocurrir en otros compartimientos celulares (Kinoshita *et al.* 1999).

3.1.1- Las citoquininas

La senescencia foliar debe ser considerada como una forma de muerte celular programada. Los datos sobre la función de las citoquininas en la senescencia surgen de estudios sobre:

- Aplicación exógena de citoquininas, que retrasan la senescencia tanto de hojas unidas a la planta como de las aisladas e incubadas en oscuridad.
- Correlación entre los niveles endógenos de citoquininas y grado de senescencia, habiéndose observado que la concentración de estas hormonas disminuye al ir progresando la senescencia.

Aunque las hojas pueden sintetizar citoquininas, se asume que la fuente principal de estas hormonas es la raíz. De hecho, el inicio de la senescencia en muchas plantas se correlaciona con una brusca caída de la concentración de citoquininas en el flujo xilemático (Azcón Bieto y Talón 2000).

Varios grupos han utilizado el gen *ipt*, aislado de *A. tumefaciens*, que codifica para la enzima *isopentenil transferasa*. Esta enzima cataliza la formación de isopenteniladenosina-5-fosfato a partir de adenosina-5-fosfato e isopentenildifosfato. Posteriormente, las plantas pueden convertir este intermediario en otras citoquininas que

incluyen la transzeatina y su ribósido, consideradas como las citoquininas más importantes en las plantas (Hedden and Phillips 2000). Cabe mencionar que el paso catalizado por la *isopentenil transferasa* es considerado como limitante de la síntesis de citoquininas en plantas (Crozier *et al.* 2000).

3.1.2- Citoquininas biosíntesis y metabolismo

Las citoquininas son derivados de la adenina descubiertas por Miller *et al.* (1956), quienes demostraron que el crecimiento celular se inducía a través de las auxinas, porque la adición simultánea de citoquininas sintéticas como la kinetina era necesaria para inducir la división celular. El ápice radicular es el sitio principal de la biosíntesis de citoquininas en la planta. Las citoquininas son transportadas a través del xilema de la raíz a los brotes (Letham 1994). Pequeñas cantidades de citoquininas también pueden ser sintetizadas en el ápice del brote y algún otro tejido de las plantas (Chen and Petschow 1978; Singh *et al.* 1992).

3.2- Regulación de la senescencia

Es evidente que el inicio y el ritmo con que se desarrolla la senescencia deben estar estrictamente regulados. Existen evidencias que indican que la senescencia involucra la expresión relativamente específica de un grupo de genes asociados a la misma (Gepstein 2004). Varios de estos genes asociados a la senescencia codifican hidrolasas, o enzimas involucradas en la síntesis de aminoácidos, pero otros tienen un rol regulador.

La expresión de varios factores transcripcionales, de genes involucrados en la biosíntesis de etileno y en vías de señalización, aumentan durante la senescencia (Gepstein 2004). Se han identificados blancos de acción de factores transcripcionales asociados a la senescencia (Robatzek and Somssich 2002).

El conocimiento actual sobre la regulación de la senescencia foliar comprende una lista de genes y mutaciones asociadas con el desarrollo de este proceso. Distintos grupos de genes asociados a la senescencia se expresan dependiendo del factor inductor de la senescencia, las condiciones ambientales, presencia de factores de estrés, o por la acción de distintas hormonas (Weaver *et al.* 1998, He *et al.* 2001). Estas observaciones sugieren que pueden existir distintas vías regulatorias que controlan el desarrollo temporal de la senescencia de las hojas.

3.2.1- Expresión del transgen *ipt*

La obtención de plantas transgénicas que expresen el gen *ipt* ha sido difícil porque incluso una débil expresión del gen durante la regeneración suprime la formación de raíz. Por ello, se hicieron intentos de manipular los niveles endógenos de citoquininas con el gen *ipt* vinculados a diferentes promotores. Los primeros trabajos se realizaron con el promotor nativo (Ooms *et al.* 1991) y el promotor CaMV35S (Smigocki and Owens 1988). Sin embargo, la sobreexpresión constitutiva del gen *ipt* impidió el normal desarrollo de la planta, debido a la gran supresión de la formación de la raíz durante la regeneración, lo que impedía el estudio de las citoquininas en el plano de la planta completa.

Para permitir el normal desarrollo de las plantas transgénicas en estudios posteriores se utilizaron promotores inducibles. Inicialmente se estudiaron promotores

inducibles por shock térmico (Medford *et al.* 1989, Smart *et al.* 1991, Smigocki 1991). Estas plantas a menudo mostraron un crecimiento pobre de raíz y un mayor crecimiento de los brotes axilares, en comparación con la plantas control.

Posteriormente se estudiaron otros promotores inducidos por el ambiente o tejido específico como los promotores controlados por la luz (Thomas *et al.* 1995), por heridas (Smigocki *et al.* 1993), fruto específicos (Martineau *et al.* 1994), hormona específicos (Li *et al.* 1992) y semilla específicos (Roeckel *et al.* 1997). Éstos proporcionaron un mayor nivel de control sobre la expresión génica *ipt* que los promotores de shock térmico. Sin embargo, en muchos casos la producción de citoquininas, tampoco ha podido ser adecuadamente regulada. Posteriormente se estudiaron otros promotores tales como el inducido por cobre (McKenzie *et al.* 1998), inducible por tetraciclina (Redig *et al.* 1996, Faiss *et al.* 1997) y promotores específicos de la senescencia (Gan y Amasino 1995).

Estos sistemas proporcionan un control mucho más estricto de la expresión génica *ipt*. Gan y Amasino (1995) desarrollaron un sistema autorregulado de expresión del gen *ipt* utilizando el promotor SAG12 asociado a la senescencia, para así poder identificar el papel de las citoquininas en el retraso de la senescencia.

3.3- Evaluación de la senescencia

3.3.1- Clorofila *a* y *b* - Cuantificación

Entre los caracteres más externos de los vegetales, el más notable y característico es probablemente el color. El color no es únicamente un carácter llamativo de la vegetación, sino que además, algunos de los pigmentos que lo condicionan están estrechamente ligados a las actividades fisiológicas del propio vegetal. Por consiguiente, el estudio de cómo las plantas viven y se desarrollan requiere el previo conocimiento de los pigmentos vegetales.

Es posible encontrar en el reino vegetal todos los matices y combinaciones de colores del espectro, existe un predominio general de los colores primarios: verde, amarillo, rojo, azul. Estos colores son conferidos a los vegetales por determinados compuestos químicos definidos llamados pigmentos. El color particular que presenta un determinado órgano vegetal depende generalmente del predominio de uno u otro o la combinación de ellos. Se debe tener claro que cuando un vegetal presenta un color blanco, es debido a la falta de tales pigmentos. La luz solar que incide sobre ellas no es absorbida selectivamente como ocurre en las partes coloreadas, sino que es transmitida o reflejada prácticamente sin sufrir modificación (Mancilla y col. 2002).

El color verde tan uniformemente presente en los vegetales es debido a la presencia de dos pigmentos estrechamente emparentados llamados clorofila *a* y clorofila *b*. Se encuentran prácticamente en todas las plantas con semilla, helechos, musgos y algas. Pueden formarse en las raíces, tallos, hojas y frutos a condición de que estos órganos estén situados por encima del suelo y queden expuestos a la luz. También aunque aparentemente falten en algunas hojas de color rojo o amarillo, cuando se extraen las otras sustancias colorantes de estas, puede comprobarse incluso allí la presencia de las clorofilas, que estaban enmascaradas por los demás pigmentos.

Estos pigmentos se encuentran en el interior de las células vegetales específicamente en una organela llamada cloroplasto. Los cloroplastos son simplemente plástidos que contienen pigmentos clorofílicos. Los compuestos clorofílicos están

ligados químicamente con las estructuras internas del cloroplasto (membrana tilacoides) y se hallan retenidos en estado coloidal. Asociados con las clorofilas, existen también en los cloroplastos dos clases de pigmentos amarillos y amarillo-anaranjados que son las xantofilas y carotenoides (Mancilla y col. 2002).

Las clorofilas presentan una estructura molecular de gran tamaño de tipo porfirínico, estando formada en su mayor parte por carbono e hidrógeno; constituyendo un anillo tetrapirrólico ocupado en el centro por un único átomo de magnesio, rodeado por un grupo de átomos que contienen nitrógeno. Del anillo parte una larga cadena de 20 átomos de carbono, denominada fitol que constituye el punto de anclaje de la molécula de clorofila a la membrana interna del cloroplasto, el orgánulo celular donde tiene lugar la fotosíntesis (Figura 6).

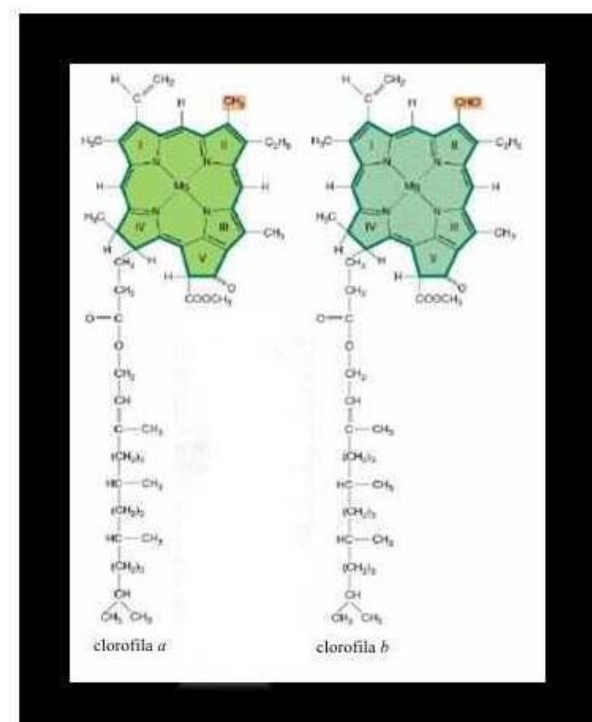


Figura 6- Estructura molecular de la clorofila *a* y clorofila *b*.

Los pigmentos clorofílicos son insolubles en el solvente universal llamado agua. Pero sí son solubles (afinidad química) en solventes orgánicos como por ejemplo alcohol etílico y acetona. A los solventes que extraen simultáneamente todos los pigmentos de la hoja se los suele llamar extractantes. Existen otros solventes que presentan afinidad por algunos pigmentos y se los llama separadores, como por ejemplo el tetracloruro de carbono y el éter de petróleo.

Se puede extraer fácilmente las clorofilas de hojas de plantas con diversos disolventes orgánicos, y mediante un espectro de absorbancia determinar la concentración de dichos pigmentos. Las clorofilas tienen típicamente dos picos de absorción en el espectro visible, uno en el entorno de la luz azul (400-500 nm de longitud de onda), y otro en la zona roja del espectro (600-700 nm) (Figura 7); sin embargo reflejan la parte media del espectro, la más nutrida y correspondiente al color verde (500-600 nm). La clorofila *a* y clorofila *b* tienen un pico de máxima absorbancia en el rango del rojo, cuyas longitudes de onda son 663 y 645 nm, respectivamente, cuando se realiza su extracción con acetona al 80% (Arnon 1949).

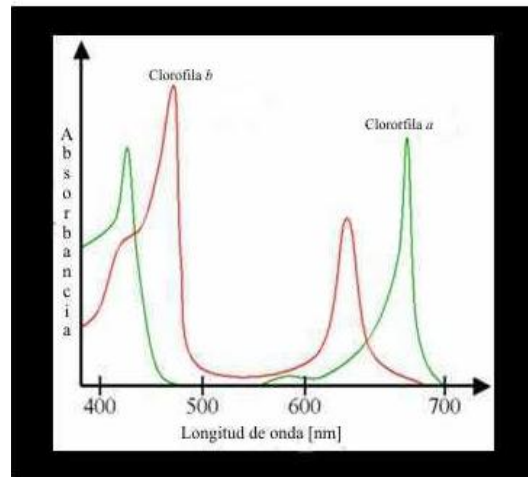


Figura 7- Picos de absorción en el espectro visible y longitud de onda. Clorofila *a* y *b*.

Durante el último medio siglo, para la determinación de clorofila en plantas superiores y algas verdes, se utilizó con mayor frecuencia la metodología propuesta por Arnon (1949), empleando ecuaciones simultáneas para determinar las concentraciones de clorofila *a* y *b* en extracto acuoso de acetona al 80% (v/v). Estas ecuaciones sin embargo, fueron desarrolladas usando un coeficiente de extinción para clorofila *a* y *b* derivados de datos espectrofotométricos inexactos. Por lo tanto, las ecuaciones de Arnon determinan valores de clorofila *a* y *b* inexactos, dando una relación *a/b* más baja en todos los casos. A partir de esto Porra *et al.* (1989), formulan nuevos y exactos coeficientes de extinción y ecuaciones simultáneas para determinar el contenido de clorofila *a* y *b* en extractos obtenidos con diferentes solventes, verificando la concentración de clorofila estándar, a través de un espectrómetro de absorción atómica.

3.3.2- Proteínas foliares solubles totales - Cuantificación

Los procesos degradativos en las plantas son complejos y comienzan mucho antes de que se manifieste externamente la fase de senescencia, la cual se define como la finalización de la actividad funcional de células, órganos y organismos. Las alteraciones de tipo morfológico, anatómico y funcional asociadas al proceso, ocurren en cada órgano y se reflejan en toda la planta. Debido a que las funciones de la hoja tienen una influencia directa sobre la acumulación de materia seca, se han realizado un gran número de investigaciones sobre la senescencia foliar en plantas cultivadas para tratar de establecer las bases genéticas del proceso (Crafts-Brandner *et al.* 1984; Ceppi *et al.* 1987).

En la hoja, los procesos deteriorativos empiezan a observarse una vez que se alcanza la máxima expansión con la aparición de un amarillamiento gradual de la lámina, pérdida de turgencia de los tejidos, marchites progresiva y necrosis. Estos cambios son una manifestación de la actividad metabólica de las células, genéticamente determinada y expresada en cambios en la actividad de ciertas enzimas, síntesis y degradación de compuestos tales como proteínas, pigmentos, fenoles y otros (Thomas and Stoddart 1977)

La degradación de proteínas es un evento muy relacionado con el envejecimiento foliar; la concentración de proteína disminuye a medida que progresa la senescencia (Thomas and Stoddart 1980; De Lucca y Trippi, 1982a), habiéndose observado que la disminución rápida del contenido de proteína en plántulas de avena

estaba asociada con los cambios en la actividad de proteasas (Drivdahl and Thimann, 1997) y con variaciones en factores ambientales tales como la relación luz-oscuridad (De Lucca y Trippi, 1982b).

Entendiendo la senescencia como un conjunto de eventos fisiológicos y bioquímicos sincronizados, es necesario caracterizar los marcadores del proceso cuya selección deberá estar correlacionada con alguna característica anatómica, morfológica o funcional asociada con la manifestación de los síntomas.

Un punto importante en la senescencia de la planta, es cómo la proteína de la hoja, hasta el 75% de la que se encuentra dentro del cloroplasto, es degradada y movilizada. Muchos genes que codifican para proteasas muestran expresión inducida durante la senescencia, pero como codificarían enzimas localizadas en la vacuola, entonces no estarían en contacto con las proteínas de las membranas del cloroplasto hasta finales de la senescencia. Por otro lado, existen informes que indican que la degradación de las proteínas del estroma como la Rubisco y la glutamina sintetasa puede ser iniciado no enzimáticamente por las especies reactivas del oxígeno (ROS) cuando los cloroplastos se incuban en condiciones de estrés foto-oxidativo (Ishida *et al.* 1999, 2002; Roulin and Feller 1998). Sin embargo, no está claro si un aumento de las ROS, podría iniciar la degradación temprana de Rubisco durante la senescencia.

Aunque los niveles de ROS se incrementan durante la senescencia, es probable que sea resultado de los procesos de degradación de macromoléculas, por lo tanto se producen después de iniciada la degradación de proteínas y lípidos. Hay informes de la actividad de aminopeptidasas y metalloendopeptidasas en el cloroplasto y también la localización de los cloroplastos como miembro de la familia de las proteasas Clp (Roulin and Feller 1998). Estas enzimas pueden tener un papel en la renovación de las proteínas durante el desarrollo foliar, pero no hay pruebas claras que demuestren que controlen la degradación de proteínas durante la senescencia (Shikanai *et al.* 2001).

Las proteínas citoplásmicas, según Byers (1971), son las precipitables de un extracto después de separar la fracción que contiene clorofilas y su composición depende del método usado para separar el material cloroplástico. Esta definición, aunque aceptable, es poco precisa, ya que en la disgregación del material y fraccionamiento proteico pueden producirse contaminaciones debido a la ruptura de ciertos orgánulos como cloroplastos, mitocondrias, núcleos, etc. (Stahmann 1963).

Para la extracción de las proteínas foliares hay que realizar una disgregación del material vegetal en presencia de un extractante cuya función es, al menos teóricamente, que las proteínas pasen cuantitativamente al medio extractante con el menor deterioro posible. Los extractantes empleados son muy numerosos y dentro de ellos se encuentra el tampón fosfato pH 7, cloruro sódico, hidróxido sódico, agua, ácido clorhídrico y tampón tris-glicinaglucosa pH 8,5.

Las sustancias interferentes pueden proceder de los extractantes o de los compuestos celulares. De entre estos últimos, los de naturaleza fenólica son los que presentan mayores dificultades debido a su fácil oxidación a quinonas y posterior formación de complejos quinonas-proteínas bastante estables (King and Kriek 1975). Por todo ello, la cuantificación de proteínas vegetales exige una purificación previa del extracto con el fin de eliminar lo más posible las contaminaciones.

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas. Muchos de estos métodos se basan en: a) la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el UV, b) la formación de derivados químicos, o en c) la capacidad que tienen las

proteínas de unir ciertos colorantes. Cada uno de estos métodos tiene sus ventajas y desventajas, las principales se exponen en la Tabla 5.

Tabla 5. Principales métodos para la cuantificación de proteínas, principales ventaja y desventajas.

Métodos	Ventajas	Desventajas
Métodos de Absorción	No se pierden las muestras	Interfieren muchos compuestos que absorben en el UV
Métodos Derivados Colorímetros		
Biuret	Bastante específico para proteínas Muestra pocas interferencias Es barato	Tiene poca sensibilidad
Lowry	Tiene bastante sensibilidad	No todas las proteínas reaccionan igual Muestra muchas interferencias como detergentes no iónicos, sulfato amónico etc.
Bradfor	Muy sensible	Muestra interferencias con detergentes
BCA	Es el método más sensible Es el que muestra menos interferencias	
Métodos derivados Fluorométricos		
o-ftaladehído	Muy sensible	La interferencia de aminos contaminantes en la muestra No todas las muestras reaccionan igual

3.3.3- Análisis del perfil de las proteínas foliares totales a través de geles SDS-PAGE

Los geles de poliacrilamida constituyen un excelente medio de soporte para separaciones electroforéticas, dado que reúnen una serie de propiedades idóneas: transparencia, elasticidad, porosidad controlable y compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos. La poliacrilamida se forma por copolimerización de dos compuestos, la acrilamida y la bis-acrilamida (N, N'-metilén-bis-acrilamida), en una reacción iniciada por la tetrametiletiléndiamina (TEMED) y el persulfato de amonio. El radical persulfato activa al TEMED, el cual a su vez activa al monómero de acrilamida para que polimerice. Las cadenas de poliacrilamida son entrecruzadas al azar por la bisacrilamida, formándose así una red de porosidad bastante uniforme, que puede ser regulada variando las concentraciones de los monómeros.

Entre las diversas técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis*), probablemente la más utilizada es la modalidad que se lleva a cabo en presencia del detergente duodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Fue descrita por Laemmli and Cleavage (1970) y se trata de una electroforesis en la que las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturalizantes (beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, SDS que desnaturaliza y recubre a la proteína con cargas netas negativas), y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas. En la técnica de SDS-PAGE, se mezclan las proteínas con el detergente aniónico SDS para formar complejos desnaturalizados, cargados negativamente. La cantidad de SDS unido a las proteínas es proporcional a su tamaño: el SDS se une en una proporción aproximada de 1,4 g SDS/g proteína, uniéndose aproximadamente una molécula de SDS por cada dos aminoácidos de la cadena. Los complejos proteína/SDS poseen una estructura elipsoide o de bastón, donde la cadena proteica es distendida y

solubilizada por el detergente. Esta unión masiva de moléculas de SDS bloquea la carga propia de la molécula de proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas acomplejadas con SDS viajen hacia el ánodo. La separación de los complejos SDS-proteína es proporcional sólo a la masa de la proteína pues todas tienen la misma carga por unidad de masa. Se puede entonces determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína por comparación con un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos. Las movibilidades de las proteínas en los geles de SDS-PAGE son funciones lineales del logaritmo de su peso molecular.

Para la estimación del peso molecular por SDS-PAGE, se deduce de lo anterior, esta técnica permite estimar el peso molecular de una proteína, comparando su movilidad electroforética con la de proteínas de peso molecular conocido. Estas determinaciones poseen un margen de error de aproximadamente 10%. Algunos tipos de proteínas pueden mostrar una migración atípica en esta técnica, por ejemplo, proteínas con puntos isoeléctricos muy extremos (donde la carga intrínseca puede ser lo suficientemente fuerte para influir en la movilidad), o proteínas altamente glicosiladas.

La determinación del peso molecular de proteínas mediante SDS-PAGE es válida cuando se analizan cadenas proteicas individuales (subunidades), en donde se han reducido todos los enlaces disulfuro y por ende, se ha distendido toda la cadena proteica para su interacción con el SDS. Bajo estas condiciones, la migración de las moléculas obedece fundamentalmente a su peso molecular.

La técnica de SDS-PAGE posee un alto poder de resolución. El sistema electroforético está formado por dos geles de distinta porosidad y pH, el primero compacta las muestras (gel superior o concentrador) y luego el segundo las separa (en el gel inferior o separador).

Para la visualización de las proteínas separadas en la electroforesis, se utilizan diferentes productos para la tinción: coomassie blue, plata, cobre, zinc, fluorocromos o *Western blotting* o inmunodetección.

En los análisis de proteínas foliares generalmente se pretende observar una disminución en la intensidad de las bandas que representan del perfil dicho tipo de proteínas. Teniendo en cuenta que muchas veces el sistema de tinción utilizado no es el adecuado para visualizar todas las proteínas, se utilizan las subunidades de la proteína Rubisco y más específicamente la subunidad mayor porque representa el mayor porcentaje de las proteínas solubles presentes en hojas.

4- Retraso de la senescencia

Existen diferentes formas de retrasar la senescencia foliar, desde la aplicación de productos a base de citoquininas, hasta el mejoramiento genético con aplicación de herramientas biotecnológicas. Si bien las dos alternativas podrían ser utilizadas, la opción más adecuada, por su mejor implementación y menor impacto ambiental, es a través del mejoramiento genético. Es frecuente, sin embargo, encontrar inconvenientes para su aplicación, tales como la utilización adecuada de los diferentes promotores, a través de los cuales se expresan los genes responsables de las vías metabólicas que involucran el retraso de la senescencia foliar. La incorporación de genes cuya expresión sea autorregulada es uno de los mayores desafíos de la biotecnología para el desarrollo de nuevos cultivares.

Tradicionalmente se ha llevado a cabo a través de métodos convencionales de mejoramiento, que involucran selección y evaluación de grandes poblaciones derivadas de cruzamientos entre materiales seleccionados por su comportamiento y la posterior selección bajo condiciones propicias. Si bien estos métodos convencionales han resultado exitosos en muchos casos, son lentos y laboriosos, ya que involucran cruza, retrocruza y selección.

La biotecnología y la biología molecular ofrecen nuevas herramientas a los mejoradores, aumentando las posibilidades y la eficiencia en la obtención de variabilidad genética y en la selección de caracteres deseables, brindando además alternativas viables para identificar, seleccionar y transferir diferentes genes. El cultivo *in vitro* fue una de las primeras herramientas utilizadas en la biotecnología. Desde sus distintas alternativas brinda soluciones para sortear barreras en los cruzamientos, colaborando además en la selección de genotipos.

En plantas forrajeras como la alfalfa, la senescencia foliar produce tanto una pérdida de la biomasa de forraje como una reducción de la calidad del mismo (digestibilidad de la materia seca, contenido de carbohidratos solubles, contenido de proteínas, metabolitos secundarios, alcaloides, etc.). El mejoramiento genético de la calidad del forraje constituye uno de los mecanismos más económicos y eficientes para el mejoramiento de la performance animal (Casler and Kaeppler, 2001). Se espera que el retraso de la senescencia genere un cambio significativo en los valores de los parámetros que determinan la calidad del forraje. Si bien es difícil establecer la magnitud de esos cambios se conoce que un 1% de incremento en la digestibilidad *in vitro* de la materia seca permite un incremento promedio de 3,2% en la ganancia de peso por animal (Casler and Vogel 1999). Por estos motivos, la manipulación de la senescencia constituye un objetivo particularmente atractivo para este grupo de especies.

La senescencia es un proceso altamente regulado en el cual algunas vías metabólicas se activan y otras se desactivan. En este contexto, en varias especies vegetales se han identificado genes que se expresan durante la senescencia foliar y se los reconoce con la denominación genérica de SAGs (Senescence Associated Genes).

La senescencia está regulada básicamente por las hormonas vegetales. Así, el etileno actúa como promotor de la senescencia mientras que las citoquininas se comportan como antagonistas de la misma. En consecuencia, altos niveles de citoquininas producen un retraso de la senescencia. Con el desarrollo de la Ingeniería Genética surgió la posibilidad de abordar en forma novedosa el estudio de la senescencia en plantas mediante la manipulación de la producción endógena de citoquininas. Cabe destacar que esta aproximación experimental no sufre de las limitaciones observadas en estudios clásicos en el tema en los que la aplicación exógena de citoquininas se ve afectada por la absorción, transporte y catabolismo de las mismas.

La caracterización funcional en alfalfa de promotores no constitutivos, aportaría una nueva y valiosa herramienta para la expresión de transgenes nucleares en esta especie.

En alfalfa existe escasa información acerca del efecto de diferentes secuencias regulatorias sobre la expresión de transgenes. Los trabajos realizados por el grupo de IGEAF se basaron en el uso del promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV) y sus derivados (Rios y col. 2007).

En forrajeras hay escasos antecedentes sobre investigaciones de promotores no constitutivos con la secuencia codificante *ipt*. Ludlow *et al.* (2000), comunicaron la obtención de plantas transgénicas de trébol blanco que expresaban la secuencia codificante *ipt* ya sea bajo el control de los promotores de *A. thaliana* SAG12 o AtMYB 32. Utilizando ambas construcciones se observaron plantas con un rango de fenotipos de normal a totalmente anormal y senescencia foliar retrasada. Sandman *et al.* (2003) han comunicado la expresión de la construcción SAG12-*ipt* en plantas transgénicas de alfalfa. Calderini *et al.* (2007) demostraron en un examen preliminar sobre el efecto de la expresión del transgen *ipt* en hojas separadas de plantas transgénicas SAG12-*ipt* de alfalfa, que éstas permanecían más verdes durante un período más extendido, respecto de los controles no transgénicos. Estas observaciones fenotípicas *in vitro* fueron similares a las del análisis *in vivo*. Estos resultados preliminares mostrarían un retardo en la senescencia foliar en plantas transgénicas primarias (T0).

Al analizar la expresión de genes durante la senescencia natural se reveló la existencia de genes SAGs con diferentes patrones de expresión, diferenciándose en dos clases, una que se expresa solamente durante la senescencia (como SAG 12 y SAG 13 en *A. thaliana*) y la otra presenta un nivel basal de expresión en el desarrollo temprano de hojas, pero que se incrementan durante la senescencia (Gan and Amasino 1995). No obstante a ello, SAG12 fue ineficaz en la expresión del gen *ipt* en *A. thaliana*. Hay que tener en cuenta que un promotor que exprese altos niveles de citoquininas puede causar efectos adversos tales como retraso en el crecimiento y desarrollo de raíces y una reducción de la dominancia apical.

El gen MYB 32 de *A. thaliana* es un miembro de la familia de los genes MYB que codifican para factores de transcripción que tienen como función coordinar la expresión de conjuntos de genes durante el desarrollo (Li and Parish 1995). Su producto contiene dominios de unión al ADN típicos de genes MYB con repeticiones R2 y R3 exclusivas de plantas y un posible dominio activador (Martin and Paz Ares 1997; Li *et al.* 1999). El patrón de expresión del promotor de este gen ha sido estudiado en trébol blanco mediante el análisis de una planta transgénica con la construcción AtMYB32-*gus*, observándose expresión en tejido vascular de hojas y raíces, y como respuesta a heridas en hojas y tallos (Lin *et al.* 2003).

Otra clase de genes, los Asociados a la Regulación de la Senescencia (SARGs), actúan antes del proceso de senescencia y, por lo tanto, son más eficaces para regular dicho proceso. Uno de esos genes se lo conoce como Receptor Kinasa Asociado a la Senescencia (SARK) (Gepstein *et al.* 2004). El promotor inducible SARK permite la expresión del gen *ipt* al inicio de la senescencia, lo que provoca un aumento de citoquininas y cuando un estrés abiótico comienza a afectar a la planta, este aumento de citoquininas retrasa la senescencia, permitiendo a la planta mantener sus funciones vitales como así también un importante recupero del estrés hídrico. De acuerdo a resultados preliminares en tabaco, Rivero *et al.* (2007) sugieren que un aumento en la producción de antioxidantes durante la sequía contribuye a proteger la maquinaria fotosintética y una mayor tolerancia al estrés.

Hipótesis de trabajo

- A-** Se puede manipular la senescencia mediante la expresión de transgenes que modifiquen la síntesis de citoquininas.
- B-** El nivel de expresión autorregulada de *isopentenil transferasa* es crucial para determinar la presencia de citoquininas en una célula vegetal.
- C-** En alfalfa, el promotor MYB 32 de *Arabidopsis thaliana* tiene un patrón espacio-temporal de expresión similar al observado en trébol blanco.
- D-** El retraso de la senescencia obtenido por ingeniería genética en alfalfa permite mantener los niveles de proteínas totales.

Objetivos

Objetivo General

Manipular la senescencia en alfalfa por Ingeniería Genética.

Objetivos Particulares

- A-** Obtener plantas transgénicas de alfalfa que contengan el transgen *AtMYB32-ipt*.
- B-** Estudiar en alfalfa el patrón espacio-temporal de expresión de los promotores *AtMYB32* de *Arabidopsis thaliana* y 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV), mediante la obtención de plantas transgénicas de alfalfa con el transgen *AtMYB32-gus* y *35S-gus*
- C-** Analizar molecularmente las plantas obtenidas en A y B.
- D-** Evaluar la senescencia en plantas que expresen el transgen *AtMYB32-ipt*.

5- Materiales y Metodologías

5.1- Material vegetal

El material vegetal utilizado en los experimentos de transformación genética estuvo formado por los clones de alfalfa C2-3 y C2-4, cedidos por el Dr. Bryan McKersie del Crop Science Department de la Universidad de Guelph, Canadá y el clon 19/17 (Moltrasio *et al.* 2004). Este último, fue obtenido en el IGEAF a partir de la selección de cultivares comerciales cedidos por el programa de Mejoramiento Genético de alfalfa de INTA y su posterior cruzamiento con los clones C2-3 y C2-4.

Los materiales antes mencionados poseen buen comportamiento *in vitro*, es decir elevado porcentaje de regeneración y una gran multiplicidad (número de embriones somáticos por callo), y probada aptitud para la transformación genética.

5.2- Transformación de *A. tumefaciens*, caracterización y mantenimiento de las colonias

5.2.1- Cepas de *A. tumefaciens*

AGL1: Cepa descrita por Lazo *et al.* (1991), se obtuvo a partir de la cepa C58 y contiene un plásmido *helper* de virulencia derivado del pTiBo542, con resistencia a carbenicilina.

LBA4404: Cepa descrita por Hoekema *et al.* (1983), contiene un gen para resistencia a rifampicina en el cromosoma bacteriano y el plásmido *helper* de virulencia pAL 4404, con resistencia a estreptomicina.

C58C1RifpGV2260: Cepa descrita por Van Haute *et al.* (1983), contiene un gen para resistencia a rifampicina en el cromosoma bacteriano y un plásmido *helper* de virulencia pGV2260, con resistencia a carbenicilina.

5.2.2- Vectores Binarios

Se utilizó el promotor del gen MYB32 de *Arabidopsis thaliana*, miembro de la familia de los genes MYB que codifican para factores de transcripción.

El vector binario **AtMYB32-*ipt*** (Figura 8) contiene el gen de interés *ipt* que codifica para la enzima isopentenil fosfotransferasa, el mismo se encuentra bajo el control del promotor AtMTY32 y el terminador polyA *ipt*. Como marcador de selección en planta, se utilizó la secuencia codificante del gen *nptII* (Carrer *et al.* 1993), que codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa II de *E. coli*, confiriendo resistencia a kanamicina, el cual se encuentra bajo el control de promotor y terminador CaMV35S del virus del mosaico del coliflor.

pAtMYB32-*ipt* (11030 pb)

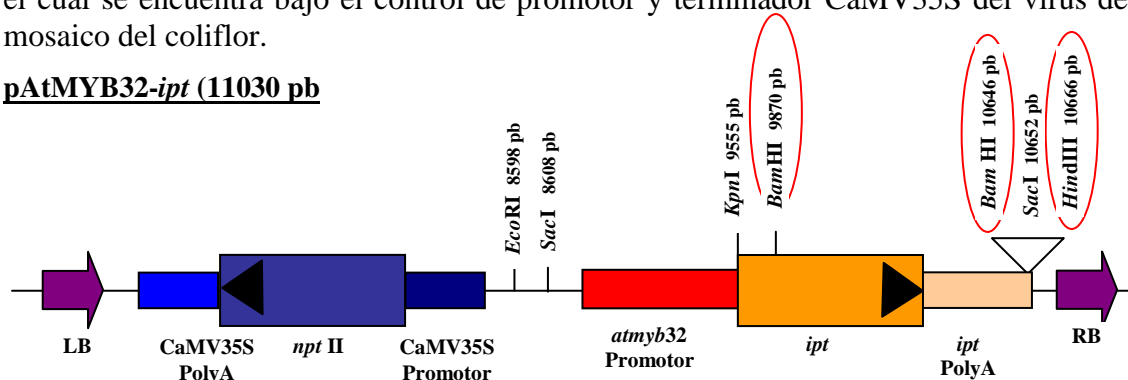


Figura 8- Mapa de restricción del T-DNA del vector binario pAtMYB32-*ipt*.

El vector binario **AtMYB32-*gus*** (Figura 9) contiene el gen reportero *gusA*, es un gen de origen bacteriano que codifica para la enzima β -glucuronidasa, el cual se encuentra bajo el control del promotor AtMYB32 y el terminador Nos del gen *nos* de *A. tumefaciens*, que codifica para la enzima nopalina sintetasa. En este vector también se utiliza el mismo gen de selección en planta *nptII* con el mismo promotor y terminador.

pAtMYB32-*gusA* (12123 pb)

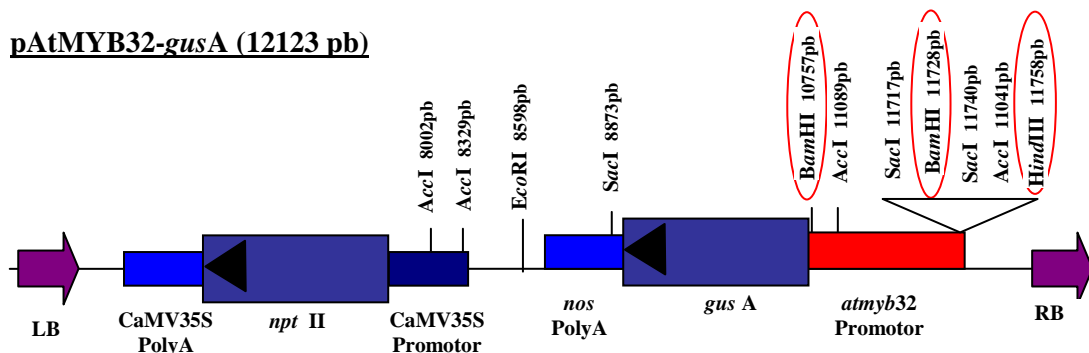


Figura 9- Mapa de restricción del T-DNA del vector binario pAtMYB32-*gusA*.

Estos vectores fueron introducidos por electroporación en las cepas AGL1, LBA4404 y C58C1RifpGV2260 de *A. tumefaciens*.

5.2.3- Transformación de *A. tumefaciens*

La transformación de *A. tumefaciens* se realizó por electroporación siguiendo el protocolo descrito por Wen-jun and Forde (1989). Para ello se utilizaron células bacterianas electrocompetentes de las cepas AGL1, LBA4404 y C58C1RifpGV2260, así como un equipo de electroporación, modelo GENE PULSER II de BIO-RAD. (Anexo A 1.1 p146).

Los antibióticos empleados para el crecimiento de las colonias de las diferentes cepas bacterianas se describen a continuación.

- LBA4404:

- * Rifampicina; el gen de resistencia es cromosómico [100 mg/l].
- * Estreptomicina; el gen de resistencia se encuentra en el plásmido *helper* [300 mg/l].
- * Espectinomicina; el gen de resistencia está en el vector binario [100 mg/l].

- AGL1:

- * Carbenicilina; el gen de resistencia se encuentra en el plásmido *helper* [100 mg/l].
- * Espectinomicina; el gen de resistencia está en el vector binario [100 mg/l].

- C58C1RifpGV2260:

- * Rifampicina; el gen de resistencia es cromosómico [100 mg/l].
- * Carbenicilina; el gen de resistencia se encuentra en el plásmido *helper* [100 mg/l].
- * Espectinomicina; el gen de resistencia está en el vector binario [100 mg/l].

5.2.4- Caracterización de colonias de *A. tumefaciens*

Las colonias de *A. tumefaciens* obtenidas por electroporación, fueron caracterizadas por resistencia a antibióticos, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), digestión con enzimas de restricción y por la prueba de la cetolactosa.

Las colonias fueron conservadas para su uso diario y su mantenimiento, como estrías en placa y en cultivos saturados a -70°C (glicerol al 20%) respectivamente.

5.2.4.1- Caracterización molecular

Se hicieron análisis moleculares mediante PCR a partir del ADN de las colonias con el fin de determinar la presencia de los genes *virC* (gen de virulencia), *nptII* (gen de selección), *ipt* (gen de interés) y *gusA* (gen reportero).

Además se caracterizó el ADN plasmídico realizando digestiones con diferentes enzimas de restricción, que serán indicadas más adelante.

5.2.4.1.1- Extracción de ADN de *A. tumefaciens*

Para la extracción del ADN total de *A. tumefaciens* se utilizó el protocolo ajustado en el Laboratorio de Biotecnología de Forrajes del IGEAF (Anexo A 1.2 p147).

5.2.4.1.2- Detección de los genes *virC*, *nptII*, *ipt* y *gusA* por PCR

Se realizaron reacciones de PCR para detectar el gen de virulencia, *virC* (Sawada *et al.* 1995) inserto en el plásmido *helper* y el gen *nptII* (Desgagnés *et al.* 1995) presente en los vectores binarios utilizados. La presencia de ambos plásmidos es un requisito para la transformación de plantas vía *A. tumefaciens*. Además, se analizaron la presencia de los transgenes *ipt* y *gusA* en el vector binario.

Las características de la reacción de PCR, la secuencias de los *primers* utilizados en las reacciones de PCR y los programas de ciclado para cada gen, se detallan en las Tablas 6, 7, 8, 9 y 10.

El volumen final de la reacción en todos los casos fue de 25 μL .

Las reacciones se realizaron en un ciclador Biometra (*UNO-termoblock*) y ciclador Eppendorf A6 (*Master cycler eppgradientes*).

Tabla 6- Características de la reacción de PCR.

Reactivos	Concentración final
<i>Buffer</i> de PCR [Tris-HCl (pH: 8,4) 200mM, KCl 500 mM]	1x
4 dNTPmix	0,5 mM
Cl ₂ Mg	1,5 mM
<i>Primer 1</i>	0,4 μM
<i>Primer 2</i>	0,4 μM
<i>Taq</i> polimerasa	1 U
ADN*	1 μL o 10 ng

* (Obtenido del protocolo de extracción para *A. tumefaciens*)

Tabla 7- Secuencias de *primers* para los genes *virC* y *nptII*.

Gen	Secuencia del par de <i>primers</i>	Tamaño del producto	Temperatura de <i>annealing</i>
<i>virC</i>	5' ATCATTTGTAGCGACT 3' 5' AGCTCAAACCTGCTTC 3'	730pb	47°C
<i>nptII</i>	5' CAGACAATCGGCTGCTCTGAT 3' 5' TGGGATGTTTCGCTTGGTGGT 3'	343pb	60°C

Tabla 8- Programas de ciclado de PCR para los genes *virC* y *nptII*.

Períodos	<i>virC</i>		<i>nptII</i>	
	Temperaturas	Tiempos	Temperaturas	Tiempos
Desnaturalización inicial	94°C	3'	94°C	5'
Desnaturalización	94°C	1'	94°C	1'
Hibridación	47°C	1'	60°C	30''
Extensión	72°C	1'	72°C	1'
Extensión final	72°C	5'	72°C	8'
Ciclos		35		35

Tabla 9- Secuencias de *primers* para los genes *gusA* e *ipt*.

Gen	Secuencia del par de <i>primers</i>	Tamaño del producto	Temperatura de <i>annealing</i>
<i>gusA</i>	5' ACGTCCTGTAGAAACCCAA 3' 5' CCCGCTTCGAAACCAATGCC 3'	1809pb	58°C
<i>ipt</i>	5' GGAAGAAGTGAAGGAACGACG 3' 5' TGGCGTAACCTAATACATTCCG 3'	583pb	60°C

Tabla 10- Programas de ciclado de PCR para los genes *gusA* e *ipt*.

Períodos	<i>gusA</i>		<i>ipt</i>	
	Temperaturas	Tiempos	Temperaturas	Tiempos
Desnaturalización inicial	94°C	5'	94°C	5'
Desnaturalización	94°C	1'	94°C	1'
Hibridación	58°C	1'	60°C	30''
Extensión	72°C	1'	72°C	1'
Extensión final	72°C	8'	72°C	10'
Ciclos		35		35

5.2.4.1.3- Análisis de los productos de amplificación por PCR

El análisis de los productos de amplificación se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en *buffer* TAE [1x] (Tris base, 108 gr/l; ácido fosfórico 85%, 15,5 ml/l; EDTA 0,5 M pH: 8) con la adición de bromuro de etidio [2,5 mg/ml]. El volumen de siembra de la muestra fue de 25 µl. La corrida electroforética se realizó a 50 volts.

Como marcador de peso molecular se utilizó 1 Kb ADN *Ladder* (Invitrogen) (Anexo A 3.4 p180). El tamaño de la banda amplificada se determinó comparando su

ubicación con la del marcador de peso molecular utilizado. Para la visualización y fotografía del gel se utilizó un equipo de documentación de geles UVP Gi Box (*ChemHR16 LFB gel documentation and analysis system*).

5.2.4.1.4- Digestiones del ADN plasmídico con enzimas de restricción

Para caracterizar el ADN plasmídico se realizaron digestiones con diferentes enzimas de restricción, las cuales fueron seleccionadas a partir de los mapas de restricción disponibles (Figuras 8 y 9). Las enzimas empleadas se detallan en la Tabla 11.

Tabla 11- Esquemas de digestiones con enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI*.

Plásmidos	Enzima	Buffer de reacción
AtMYB32- <i>ipt</i>	<i>HindIII</i>	E
	<i>BamHI</i>	E
AtMYB32- <i>gusA</i>	<i>HindIII</i>	E
	<i>BamHI</i>	E

Buffer E: 60 mM Tris-HCl pH: 7,5, 1mM NaCl, 60 mM MgCl₂ y 10 mM DTT.

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µl, con las características de reacción descritas en la Tabla 12. Todas las digestiones se mantuvieron a 37°C durante 3 horas.

Tabla 12- Características de reacción de digestión de los plásmidos.

Reactivos	Concentración final
Buffer de la enzima [10x]	0,1 µl/µl
Enzima	0,2 u/µl
BSA	0,1 mg/ml
ADN	60 ng/µl

5.2.4.1.5- Análisis de los productos de digestión

El análisis de los productos de las digestiones se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa como se indica en el punto 5.2.4.1.3. En esta ocasión el gel de agarosa se preparó al 1%.

5.2.4.2- Caracterización bioquímica

La identidad de las colonias de *A. tumefaciens* fue corroborada mediante la prueba de cetolactosa (Hooykaas 1988), específica para *Agrobacterium*. Se toma una colonia bacteriana y se siembra un círculo de 0,5 cm de diámetro en medio de reacción (lactosa 20g/l; extracto de levadura 1g/l; agar 20 g/l). Se incuba a 28°C durante 24 h. Una vez finalizado este período, se agrega sobre las colonias el reactivo de Benedict (Tri-Na citrato 173 g/l; Na₂CO₃ 100 g/l; CuSO₄ x 5H₂O 17,3 g/l).

El fundamento de esta prueba se basa en la capacidad de *Agrobacterium* para utilizar lactosa como única fuente de carbono produciendo así un intermediario, la cetolactosa, que en presencia del reactivo de Benedict reacciona dando un compuesto amarillo fluorescente característico.

La prueba se considera positiva cuando se observa un halo amarillo alrededor de la colonia, luego de transcurrida una hora desde el momento en que se agregó reactivo de Benedict.

5.3- Obtención de plantas transgénicas de alfalfa vía *A. tumefaciens*

5.3.1- Explante Vegetal

Se utilizaron como blanco de transformación pecíolos y embriones somáticos, provenientes de los clones descritos en el punto 5.1, dichos explantes fueron obtenidos y acondicionados como se detalla a continuación.

5.3.1.1- Preparación de los pecíolos utilizados como blanco de transformación

Los segmentos de pecíolos jóvenes fueron extraídos de ramificaciones vegetativas en activo crecimiento de las plantas de alfalfa. Dichos pecíolos inicialmente se desinfectaron por inmersión, primero en etanol 70% por 1 minuto y luego en una solución de hipoclorito de sodio (2% de cloro activo) y gotas de Tween 20, durante 20 minutos con agitación a 150 rpm (*Orbit Shaker- Lab-line*). Posteriormente en flujo laminar fueron lavados 3 veces con abundante agua destilada estéril y cortados en segmentos de 1 cm. aproximadamente.

5.3.1.2- Obtención de embriones somáticos utilizados como blanco de transformación

Para la obtención de embriones somáticos, se partió del cultivo *in vitro* de folíolos jóvenes de alfalfa. Dichos folíolos inicialmente se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio (2% de cloro activo) y gotas de Tween 20, durante 20 minutos con agitación a 150 rpm (*Orbit Shaker- Lab-line*). Posteriormente, en flujo laminar fueron lavados 3 veces con abundante agua destilada estéril.

Los folíolos fueron sembrados en medio MS de inducción, que consiste en el medio MS (Murashige and Skoog 1962) gelificado con 6,5 g/l de agar, suplementado con 2,4 D, 2 mg/l; Kinetina, 0,25 mg/l; prolina 3 g/l y citrato tribásico de potasio 4,5 g/l. Al medio MS de inducción se le agregó luego de autoclavado el bacteriostático cefotaxime (Cx) (100mg/l). Los folíolos fueron mantenidos por 15-20 días a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura, en oscuridad, al cabo de los cuales se obtuvieron callos embriogénicos. Éstos callos fueron transferidos en condiciones de esterilidad a placas que contenían MS de regeneración (MS con, 40 g/l de maltosa y gelificado con 10 g/l de agar) para obtener embriones somáticos. A partir de este punto las condiciones de luz y temperatura fueron, 16 horas de fotoperíodo y $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Transcurridos 20 a 30 días, se obtuvieron embriones con diferentes estados de desarrollo (Figura 10), utilizándose los del tipo torpedo (C) como blanco en las transformaciones vía *A. tumefaciens*.



Figura 10- Estados embriones somáticos de alfalfa. A) Globular, B) Corazón y C) Torpedo.

5.3.2- Cultivo Bacteriano

Se utilizaron las colonias de *A. tumefaciens* transformadas con los vectores binarios pAtMYB32-*ipt* y pAtMYB32-*gus* que demostraron tener los componentes necesarios para su uso en transformación genética, según lo descrito en el punto 5.2.4.1.

Para la transformación de pecíolos y embriones las colonias bacterianas se cultivaron previamente en medio líquido MinA (Leemans *et al.* 1981), suplementado con los antibióticos correspondientes, según la cepa utilizada, durante aproximadamente 16 horas con agitación a 28 °C, hasta alcanzar una DO_{600nm} entre 0,5 y 0,8.

5.3.3- Transformación de explantes y obtención de plantas transgénicas

Para los experimentos de transformación se siguió el protocolo desarrollado por Rios y col. (2007), utilizando pecíolos y embriones somáticos obtenidos según los puntos 5.3.1.1 y 5.3.1.2, a los cuales se les realizaron pequeños cortes con bisturí y se los inoculó por inmersión durante 2 minutos con bacterias de las diferentes cepas de *A. tumefaciens* (LBA4404, AGL1 y C58C1RifpGV2260). Se cocultivaron en oscuridad con la bacteria durante 3 días en medio SHK (Schenk and Hildebrandt 1972, modificado por Shetty and McKersie 1993), gelificado con 6,5 g/l de agar y suplementado con 2mg/l de 2,4-D, 0,2 mg/l de kinetina y 100 µM de acetosiringona (sustancia fenólica que tiene como función aumentar la virulencia de la bacteria y así potenciar la transferencia del T-ADN al genoma vegetal). Pasado dicho tiempo de cocultivo se eliminó el exceso de bacteria crecida mediante lavados, para luego repicarlos al medio SHK suplementado con 2 mg/l de 2,4-D, 0,2 mg/l de kinetina, 25 mg/l del antibiótico kanamicina, al cual da resistencia el gen *nptII* y 300 mg/l del antibiótico cefotaxime que actúa como bacteriostático frenando el desarrollo de las bacterias sobre los explantes. Se mantuvieron en cuarto de cultivo a 25°C ± 2°C y 16 horas de fotoperíodo de 30 a 45 días, con repiques intermedios cada 15 días hasta obtener callos con embriones transgénicos.

Cuando los embriones alcanzaron el estado de torpedo (Figura 10), se individualizaron y colocaron en un medio de enraizamiento MS [1/2], gelificado con 3,5 g/l de phytigel, donde se desarrollaron las plántulas, las cuales permanecieron en estas condiciones hasta ser llevadas al invernáculo, previa etapa de rusticación en tierra con condiciones de humedad controlada. El material vegetal se mantuvo en invernáculo y se obtuvieron estacas por el método de Lesins (1955) para su posterior evaluación.

5.4- Análisis molecular de plantas transgénicas

El análisis molecular se realizó en términos generales según Futterer *et al.* (1995) y consistió en la detección de los transgenes mediante la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) y en la determinación de la expresión transcripcional de los mismos mediante la técnica de RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*).

Para analizar la inserción y el número de copias del transgen en el genoma vegetal, se utilizó la técnica de *Southern blot* siguiendo los protocolos de *DIG System* de Roche (*DIG Application Manual for Filter Hybridization* 2000)

5.4.1- Detección de transgenes mediante la técnica de PCR

Para comprobar la presencia de los transgenes *nptII*, *ipt* y *gusA* en plantas transformadas, se analizó el ADN de las mismas por PCR, con *primers* específicos.

5.4.1.1- Extracción de ADN vegetal

Para extraer ADN de las plantas se siguió el protocolo de Yu *et al.* (1993) (Anexo A 1.3 p147).

5.4.1.2- Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa como se indica en el punto 5.2.4.1.3. En esta ocasión el gel de agarosa se preparó al 0,8%. De cada muestra se utilizó 1 µl de ADN. El volumen de siembra fue de 10 µl para cada muestra.

Como marcador de peso molecular se utilizó ADN del fago λ digerido con la enzima de restricción *HindIII*, sembrándose en 2 calles (100 y 300 ng totales respectivamente). Para estimar la concentración de ADN se comparó la intensidad de banda de la muestra con las del marcador de peso molecular.

5.4.1.3- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para determinar la presencia de los transgenes *ipt* y *gusA* se utilizaron *primers*, que amplifican las regiones de interés de los transgenes. Asimismo, se usó un par de *primers* que amplifican un fragmento interno del gen *nptII* presente en ambas construcciones. Para corroborar la amplificabilidad del ADN de las plantas transgénicas putativas por PCR, se utilizaron *primers* que permiten amplificar un fragmento interno del gen de *tubulina*, presente en el genoma de la alfalfa. Las características de los pares de *primers* se detallan en la Tabla 13.

Tabla 13- Características de los *primers* utilizados para la detección de genes de *tubulinas*.

Primer	Secuencia del par de <i>primers</i>	Tamaño del producto
<i>tubulina</i>	5'GTGACTTGAACCATCTGATCTC3' 5'CCATGCCTTCCCCGGTATACCA3'	550pb

La secuencia de los pares de *primers* utilizados para los genes *nptII*, *ipt* y *gusA* se detallan en las tablas 7 y 9 respectivamente.

La amplificación por PCR se llevó a cabo bajo las condiciones de reacción y ciclado que se indican en las Tablas 14 y 15 respectivamente.

Tabla 14- Condiciones de reacción de PCR.

Reactivos	Concentración final
<i>Buffer</i> de PCR [Tris-HCl (pH: 8,4) 200mM, KCl 500 mM]	1x
4 dNTPmix	0,5 mM
Cl ₂ Mg	1,5 mM
<i>Primer 1</i>	0,4 µM
<i>Primer 2</i>	0,4 µM
<i>Taq polimerasa</i>	1 U
ADN*	1 µl o 10 ng

*(Obtenido del protocolo de extracción para ADN vegetal)

Tabla 15- Condiciones de ciclado para *vir C*, *npt II*, *gusA* e *ipt*.

Períodos	<i>vir C</i>		<i>nptII</i>		<i>gusA</i>		<i>ipt</i>	
	temperatura	tiempo	temperatura	tiempo	temperatura	tiempo	temperatura	tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	3'	94°C	5'	94°C	5'	94°C	5'
Desnaturalización	94°C	1'	94°C	1'	94°C	1'	94°C	1'
Hibridación	47°C	1'	58°C	1'	58°C	1'	60°C	30''
Extensión	72°C	1'	72°C	1'	72°C	1'	72°C	1'
Extensión final	72°C	5'	72°C	8'	72°C	8'	72°C	10'
Ciclos	35		35		35		35	

En todos los casos se incluyeron controles positivos, que inicialmente consistieron en ADN plasmídico, para luego usar ADN de plantas transgénicas positivas detectadas en los primeros ensayos. Como control negativo (salvo en el caso del gen de la *tubulina*) se usó ADN de las plantas no transgénicas donantes de explantes. El control de los reactivos se llevó a cabo sin el agregado de ADN en la reacción (mix).

5.4.1.4- Análisis de los productos de amplificación por PCR

El análisis de los productos de amplificación se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa como se indica en el punto 5.2.4.1.3.

5.4.2- Detección de la actividad transcripcional por RT-PCR

La expresión del transgen *ipt* a nivel de transcriptos se analizó por RT-PCR de acuerdo a las indicaciones técnicas del proveedor del Kit (Ready-to-Go™ DNA Labeling Beads (-dCTP) (*GE Healthcare RT-PCR Beads*).

Se corroboró así la presencia de ARNm específicos para el transgen *ipt*.

5.4.2.1- Extracción de ARN

Para la extracción del ARN total de alfalfa se siguió el protocolo puesto a punto en el Laboratorio de Biotecnología de Forrajeras del IGEAF (Anexo A 1.4 p148).

5.4.2.2- Análisis cualitativo y cuantitativo del ARN

El análisis cualitativo consistió en corroborar que el ARN extraído no mostraba degradación y se realizó mediante una corrida en gel de agarosa como se indica en el punto 5.2.4.1.3. En esta ocasión el gel de agarosa se preparó al 0,8%. Se sembraron 2,5 µl de cada muestra.

El análisis cuantitativo se realizó en espectrofotómetro con luz UV a 260 nm (longitud de onda que absorbe el ARN) y a 280 nm (longitud de onda que absorbe el ADN), utilizando 5 µl de cada muestra, diluidos y homogeneizados en 995 µl de agua. Se calculó el porcentaje de contaminación de ADN como el cociente entre la absorbancia a 260 y la absorbancia a 280, este valor normalmente mantiene una relación cercana a 2:1. La concentración de ARN en µg/ml se obtuvo multiplicando el valor de la absorbancia a 260 por 40 (factor de conversión).

5.4.2.3- Tratamiento con ADNsa

Se realizó una digestión con ADNsa, para eliminar los restos de ADN genómico contaminante de la extracción de ARN, para ello se procedió de acuerdo con las indicaciones técnicas del proveedor del Kit *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega), lo cual se detalla a continuación. Las concentraciones y las características de los reactivos se indican en la Tabla 16.

Tabla 16- Características de las reacciones de digestión con ADNsa.

Componentes	Volumen por muestra
Templado de ARN	“x” µl (equivalente a 20 µg)
Buffer ADNsa [10X]	10 µl
ADNsa RQ1 [1u/µl]	3 µl
ARN sin	0,2 µl
H ₂ O libre de ARNsa	“x” µl
Volumen Final	100 µl

- 1- Incubar 30 minutos a 37°C.
- 2- Agregar 3 µl de RQ1 ARNsa (*Stop Spin*)
- 3- Incubar durante 10 minutos 65°C.
- 4- Utilizar 3 µl como muestra para la RT-PCR.

5.4.2.4- Detección de la actividad transcripcional por RT-PCR con kit Ge Healthcare

Se procedió de acuerdo a las indicaciones técnicas del proveedor del kit Ready-to-Go™ DNA Labeling Beads (-dCTP) (GE Healthcare RT-PCR Beads). (Anexo A 1.5 p150). En la Tabla 17 se describen las condiciones de ciclado para *ipt*:

Tabla 17- Condiciones de ciclado para *ipt*.

Períodos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	5'
Desnaturalización	94°C	1'
Hibridación*	60°C	30''
Extensión	72°C	1'
Extensión final	72°C	10'
Ciclos		35

5.4.2.5- Análisis de los productos de amplificación por RT-PCR

El análisis de los productos de amplificación se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa como se indica en el punto 5.2.4.1.3. En esta ocasión el volumen de siembra fue de 52 µl.

5.4.3- Análisis de la integración de ADN mediante la técnica de *Southern blot*

Para analizar la integración del transgen *ipt* en las plantas transgénicas se utilizó la técnica de *Southern blot*, siguiendo los protocolos de *DIG System* de Roche (*DIG Application Manual for Filter Hybridization* 2000). Mediante esta técnica además de corroborar la inserción del transgen en el genoma vegetal, puede evaluarse el número de copias y según el patrón de bandas es posible identificar los distintos eventos. La técnica consta de tres procesos:

- Síntesis de la sonda
- Hibridación
- Detección

Para llevar a cabo estos tres procesos, primero realizamos la extracción y cuantificación de ADN vegetal de las plantas a analizar.

5.4.3.1- Extracción de ADN vegetal

Para obtener la cantidad y calidad de ADN necesarios para realizar el *Southern blot* se siguió el protocolo descrito en el manual del CIMMYT (2005), (Anexo A 1.8 p151).

5.4.3.2- Cuantificación de ADN vegetal

Para cuantificar el ADN vegetal se utilizó un fluorómetro *Qubit® fluorometer* *Invitrogen*. Se procedió de acuerdo a las indicaciones técnicas del proveedor de *Qubit™ Quantitation Starter Kit* *Invitrogen* (Anexo A 1.9 p153).

5.4.3.3- Síntesis de la sonda

La sonda fue sintetizada mediante la técnica de PCR con una proporción de un nucleótido marcado con dioxigenina. Como templado de la reacción se tomó al azar ADN plasmídico de las colonias de *E. coli* que se utilizaron para la transformación de *A. tumefaciens*, utilizándose 50 µg de plásmido como templado. El marcado de la sonda se realizó siguiendo el protocolo de *DIG System* de Roche (*DIG Application Manual for Filter Hybridization* 2000). La relación dTTP:dUTPdig fue de 1:1. Las características

de los *primers*, de las reacciones y las condiciones de ciclado se detallan en las Tablas 13, 18 y 19 respectivamente. Para la reacción con el nucleótido marcado se hicieron 3 réplicas para poder obtener una mayor masa de la sonda.

Tabla 18- Características de las reacciones de PCR para síntesis de sonda.

Componentes	Volumen por muestra	
	PCR marcada	PCR fría
H ₂ O (HPLC)	8,88µl	16,05µl
Buffer*[10x]	4µl	2,5µl
MgCl ₂ [50mM]	1,6µl	1µl
Primer upper [10µM]	1,6µl	1µl
Primer lower [10 µM]	1,6µl	1µl
4dNTP mix [1mM]	-	1,25µl
dATP [1mM]	5µl	-
dCTP [1mM]	5µl	-
dGTP [1mM]	5µl	-
dTTP [1mM]	2,5µl	-
dUTP-dig [1mM]	2,5µl	-
Taq** [5 U/µl]	0,32µl	0,2µl
ADN plasmídico***	2µl	2µl
Volumen final	40µl	25µl

* 200 mM Tris-HCl (pH=8,4); 500 mM KCl **Platinum ®Taq DNA Polymerase Invitrogen *** ADN [25ng/µl]

Tabla 19- Condiciones de ciclado para la síntesis de la sonda.

Períodos	Temperaturas	Tiempos
Desnaturalización inicial	94°C	5'
Desnaturalización	94°C	1'
Hibridación	60°C	30''
Extensión	72°C	1'
Extensión final	72°C	10'
Conservación del ADN	6°C	24 h
Ciclos		35

5.4.3.3.1- Visualización del producto de PCR de la sonda

El análisis de los productos de amplificación se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa como se indica en el punto 5.2.4.1.3. En esta ocasión el gel de agarosa se preparó al 1% y el volumen total de siembra de cada reacción fue de 10 µl.

5.4.3.3.2- Purificación del producto de PCR (sonda)

El producto de PCR fue purificado siguiendo las indicaciones técnicas del proveedor del *kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-up System Promega* (Anexo A 1.6 p150).

5.4.3.3.3- Cuantificación de la sonda

Para cuantificar la sonda se utilizó un fluorómetro *Qubit® fluorometer Invitrogen*. Se procedió de acuerdo a las indicaciones técnicas del proveedor del *Qubit™ Quantitation Starter Kit Invitrogen* (Anexo A 1.7 p151).

5.4.3.4- Acondicionamiento del ADN para la transferencia e hibridación

5.4.3.4.1- Digestión del ADN vegetal

El ADN vegetal fue digerido con la enzima *HindIII*. Esta enzima se eligió por la particularidad de tener un sitio único de corte dentro del vector de transformación, para así visualizar el número de copias del transgen (ver sitios de corte en Figura 8).

Para la digestión del ADN se siguieron las indicaciones del prospecto de la enzima. Las características de las digestiones se indican en la Tabla 20. Las muestras se incubaron toda la noche a 37°C. El volumen de reacción fue de 275 µl.

Paralelamente a las reacciones de digestión se hicieron incubaciones de ADN sin enzima (no digerido) con la misma concentración final. Junto con las muestras de ADN vegetal se digirió el plásmido con la misma enzima como control.

Tabla 20- Características de reacción de digestión de ADN vegetal para *Southern*.

Reactivos	Concentración final
Buffer de la enzima [10x]	0,1 µl/µl
Enzima	0,2 u/µl
BSA	0,1 mg/ml
ADN	54 ng/µl

5.4.3.4.1.1- Visualización del producto de digestión

El producto de la digestión se chequeó mediante electroforesis en gel de agarosa como se indica en el punto 5.2.4.1.3. En esta ocasión el gel de agarosa se preparó al 0,8%. Para cada muestra se sembraron 10 µl de reacción.

5.4.3.4.2- Purificación del ADN digerido

Los ADNs de las muestras tanto digeridas como sin digerir, fueron purificados de la reacción de digestión para su resiembra, para ello se siguió el protocolo de purificación de ADN con cloroformo y precipitación, siguiendo las indicaciones del prospecto de *Trizol Reagent* de Invitrogen (Anexo A 1.10 p153).

5.4.3.4.3- Siembra de las muestras

Se sembraron 30 ml de los ADN digeridos (54 ng/µl) y no digeridos purificados en el paso 5.4.3.4.2, en un gel de agarosa al 1% en *buffer* TAE [1x] y se corrió 18 horas a 18 volts. En la siembra se incluyeron tanto el marcador de peso molecular 1 Kb ADN *ladder* (Invitrogen), el plásmido digerido (50 picogramos) como control y el marcador de peso molecular MKIII (*DNA Molecular Weight Marker III, Dioxigenin-labeled - Promega*).

5.4.3.4.4- Transferencia

El ADN se transfirió a una membrana de nylon (*Nylon Membranas Positively Charged* - Roche). La transferencia se realizó según la técnica descrita por Sambrook *et al.* (1989) y el protocolo que se describe en el Anexo A 1.11- p154.

5.4.3.4.5- Fijación

Una vez transferido el ADN a la membrana, se fijó utilizando un CL-1000 *Ultraviolet Crosslinker UVP*. El procedimiento seguido se detalla en el Anexo A 1.12 p154.

5.4.3.4.6- Hibridación

La sonda preparada como se indicó en el punto 5.4.3.3 se hibridó al ADN fijado a la membrana. El proceso se llevó a cabo en un horno de hibridación *Autoblot™ Hybridization Oven Bellco® Biotechnology Bellco Glass Inc.* El procedimiento seguido se detalla en el Anexo A 1.13 p155.

5.4.3.5- Detección de la sonda

Posteriormente a la hibridación se procedió a la detección de la sonda. Esta se inició con una serie de lavados según protocolo de *Southern blot DIG System - Roche* con algunas modificaciones (Engler-Blum *et al.* 1993). Luego se incubó con anticuerpo anti-dioxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (anti-DIG-AP). Finalmente se incubó con el sustrato de la enzima (CDP-star). Los pasos se detallan en el Anexo A 1.14 p 155.

5.4.3.5.1- Revelado

La membrana se reveló usando una placa radiográfica (*GE Healthcare, Amersham Hyperfilm™ ECL*). Se colocó la membrana en contacto con la placa radiográfica, realizando una leve presión para mejorar el contacto, esto se realizó en oscuridad para evitar que se vea la placa. Se probaron distintos tiempos de exposición.

Pasado el tiempo de exposición de la membrana con la placa radiográfica (10 a 30 minutos), se sumergió la placa en la solución de revelado por 1 minuto, luego se pasó a una solución de enjuague de ácido acético y finalmente a la solución de fijación, se enjuagó con agua corriente y se dejó secar, para su posterior interpretación.

5.4.3.5.2- Estripeno

Se preparó la membrana para posteriores usos con otras sondas siguiendo los pasos que se detallan en el Anexo A 1.15 p156.

5.5- Evaluación del patrón de expresión del promotor AtMYB32 en alfalfa

Una vez corroborada molecularmente por PCR la expresión del transgen AtMYB32-*gusA* (punto 5.4.1), se evaluó por tinción histoquímica la actividad *gusA* en tejidos transformados, lo cual se realizó siguiendo el procedimiento descrito por McCaben *et al.* 1988.

Para ello, se establecieron comparaciones con pecíolos transformados con los transgenes 35S-*gus* y AtMYB32-*gusA*.

Para observar el patrón de expresión del promotor se utilizaron diferentes partes de las plantas transformadas (raíces, pecíolos, hojas, estipulas, callos, etc.).

5.5.1- Visualización tinción histoquímica

El gen reportero *gusA* que codifica para la enzima β -glucuronidasa, fue detectado cualitativamente por tinción histoquímica en presencia de un sustrato específico, por la producción de un precipitado azul como resultado de la actividad de la enzima que se observa en el tejido al expresar el gen.

El reactivo X-Gluc está asociado al ácido glucurónico y la enzima β -glucuronidasa rompe los enlaces para producir ácido glucurónico más cloro-bromoíndigo, y al llevarse a cabo una dimerización se produce 5,5 dibromo 4,4 dicloro-índigo que se visualiza como precipitado azul insoluble.

5.5.2- Procedimiento tinción histoquímica

Se colocaron en placas multiposillos las muestras (raíces, pecíolos, hojas, etc.), tanto de plantas transformadas con el transgen Atmyb32-*gusA*, como de plantas transformadas con el transgen 35S-*gusA* (control positivo) y plantas no transformadas (control negativo). Se cubrieron las muestras con la solución X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucurónico), se incubaron en oscuridad toda la noche a 37°C. Transcurrido el tiempo establecido se eliminó la solución X-Gluc y se inició la decoloración de las muestras con etanol 70%. Para aumentar el contraste por extracción de clorofila y para preservar el tejido se extrajo varias veces con alcohol 70% hasta decolorar, para poder apreciar claramente los puntos y mancha azules. La visualización y la cuantificación de puntos y zonas azules se realizó bajo lupa.

Los puntos y zonas azules corresponden a eventos de transformación independientes. Cabe aclarar que la alfalfa no transgénica no tiene expresión *gus* endógena.

5.6- Evaluación de la senescencia

Para la evaluación de la senescencia foliar, se utilizaron plantas transgénicas (T_0) que demostraron expresión del transgen *ipt* por RT-PCR (punto 5.4.2.4).

5.6.1- Bioensayos de hojas cortadas

La senescencia foliar se caracterizó a través de bioensayos de hojas cortadas, de acuerdo al procedimiento indicado por Lin (2000), con modificaciones realizadas en el presente trabajo.

5.6.1.1-Ajustes de protocolo para bioensayos

Para realizar los ajustes del protocolo, se realizaron ensayos preliminares, en los cuales se consideraron diferentes condiciones tanto de desinfección, soporte de la muestra, luz/oscuridad y tiempo de duración del mismo.

Con respecto a la desinfección de las muestras, se probaron diferentes concentraciones de cloro activo y tiempos de exposición al mismo.

Se ensayaron condiciones de desinfección con cloro activo al 0,6% durante 10 minutos, al 0,3% durante 10 minutos y 15 minutos.

Como soportes de las muestras se ensayaron papel de filtro estéril humedecido con agua estéril y agar-agua 6% (p/v) contenidos en placas de Petri.

El protocolo utilizado para la desinfección y siembra del material a evaluar con las diferentes variantes se detalla en el Anexo A 1.16 p156.

El tiempo de evaluación de las muestras y condiciones de luz u oscuridad, se determinó una vez establecidas las condiciones de desinfección del material a evaluar y el soporte adecuado. Para ello se realizaron experimentos preliminares de senescencia en hojas cortadas de plantas no transformadas, para establecer así el tiempo de evaluación y condiciones de luz u oscuridad de los mismos.

Las hojas a evaluar fueron seleccionadas en función al estado de desarrollo y longevidad de las mismas (estado ontogénico), utilizándose desde la 1ª a la 9ª hoja (según esquema Figura 11 a). Para la evaluación se sembraron tres hojas por placa: en la placa A de la 1ª a la 3ª hoja, en la placa B de la 4ª a la 6ª hoja y en la placa C de la 7ª a la 9ª hoja (Figura 11 b). Las placas fueron conservadas en cámara de cultivo a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura y 16 h luz de fotoperiodo, conservando una réplica a la misma temperatura en oscuridad.

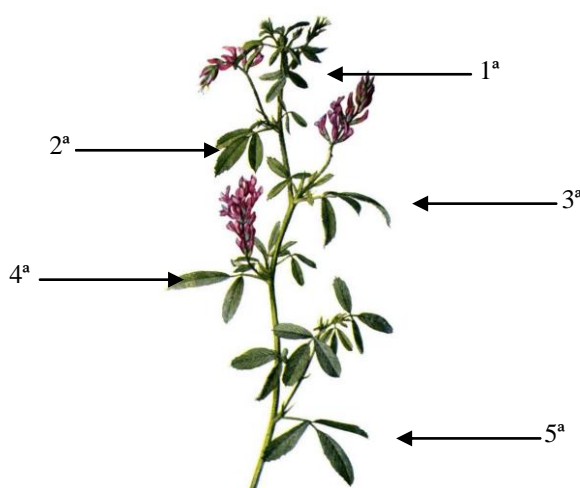


Figura 11 a- Esquema tomado en cuenta para establecer la posición de cada hoja.

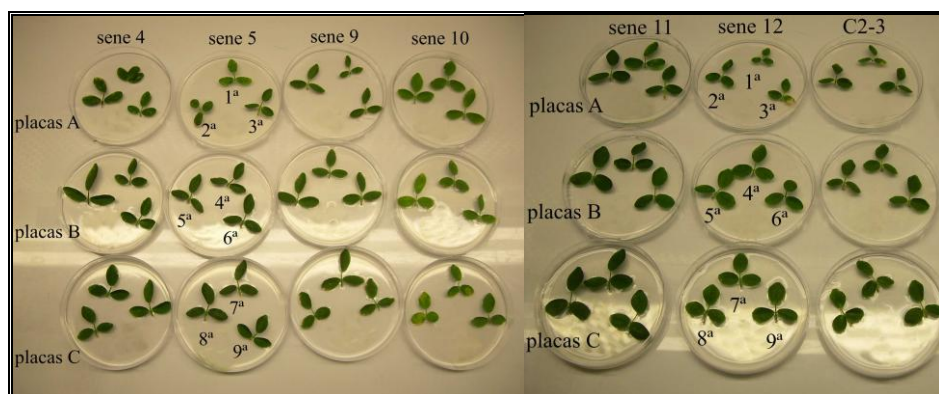


Figura 11 b- Esquema siembra de hojas para bioensayos. Conformación de los futuros bloques.

Una vez puesto a punto el protocolo, las plantas transgénicas T₀ y sus controles no transformadas, fueron evaluadas.

Inicialmente se realizó el experimento 1 en 4 bloques (I, II, III y IV), con 7 tratamientos en adelante identificados como sene 4, sene 5, sene 9, sene 10, sene 11, sene 12 y C2-3. Cada bloque está compuesto por los 7 tratamientos.

En estos bioensayos fueron sembradas en la misma placa, hojas de las plantas no transformadas (testigos) y hojas de las plantas transformadas a evaluar.

A su vez estos bioensayos fueron utilizados para cuantificar la senescencia en función al contenido de clorofila *a* y *b*, como así también en contenido de proteínas foliares solubles totales y cambios en perfil de las proteínas foliares. Para ello, las muestras fueron tomadas a los 0, 21 y 35 días, acondicionadas en N₂ líquido y conservadas a -70°C hasta su evaluación.

Posteriormente, se realizó el experimento 2 con dos bloques (I y II), pero con solo 6 tratamientos (sene 4, sene 5, sene 9, sene 10, sene 11 y sene 12), en los cuales se utilizaron solamente las hojas 6^a y 7^a, con el objeto de ajustar la composición de la muestra (hojas con el mismo estado de desarrollo y longevidad). Estas muestras fueron extraídas, acondicionadas y evaluadas como las anteriores, agregándose solamente una fecha de evaluación (14 días). En este experimento no se utilizaron como testigo hojas de plantas no transformadas (C2-3), tomando como testigos a las hojas de las plantas RT-PCR negativas (sene 5, sene 9 y sene 11).

5.6.2- Cuantificación de clorofila *a* y *b* por espectrofotometría

El contenido de clorofila *a* y *b* se determinó por espectrofotometría, midiendo la absorbancia de cada muestra con las densidades DO_{663,6} y DO_{646,6} respectivamente (Lichtenthaler 1987 y McCaben *et al.* 2001), utilizando las ecuaciones de Porra *et al.* (1989) para calcular el contenido de pigmentos en base a µg clorofila/mililitro.

$$\text{Clorofila a: } (\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}) = [(12,25 \times A_{663,6}) - (2,55 \times A_{646,6})]$$

$$\text{Clorofila b: } (\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}) = [(20,31 \times A_{646,6}) - (4,91 \times A_{663,6})]$$

Se evaluaron las plantas transgénicas sene 4, sene 10 y sene 12 (RT-PCR positivas), como testigo las plantas sene 5, sene 9, sene 11 (RT-PCR negativas) y C2-3 (planta no transformada), tanto del primer bioensayo (bloques I, II, III y IV), como del segundo (bloques I y II).

Para realizar la extracción de clorofila se aplicó el protocolo utilizado por Matthew *et al.* (2001). (Anexo A 1.17 p157).

5.6.3- Cuantificación de las proteínas foliares solubles totales y análisis del perfil de las proteínas foliares

El contenido de proteínas foliares solubles totales; se cuantificó por Fluorometría (*Quant-iT™ kit - Qubit® fluorometer - Invitrogen*) siguiendo las especificaciones técnicas del proveedor (Anexo A 1.19 p158).

Los cambios en el perfil de las proteínas foliares de las muestras se analizaron a través de geles de poliacrilamida al 10% en presencia de dodecyl sulfato de sodio (SDS-PAGE) 10%, según Laemmli (1970) y se visualizó por tinción con *Coomassie Brilliant*

Blue R-250. El sistema de gel utilizado fue el discontinuo desnaturalizante (SDS-PAGE).

Para cuantificar el contenido de proteínas foliares solubles totales y observar los cambios en el perfil de las proteínas foliares, se trabajó con los mismos bioensayos utilizados para cuantificar clorofila, pero en este caso solo tomamos una muestra de 1 cm de diámetro del folíolo del medio.

Se evaluaron plantas transgénicas RT-PCR positivas (sene 4, sene 10 y sene 12) y como testigo plantas no transformada (C2-3) y plantas transgénicas RT-PCR negativas (sene 5, sene 9 y sene 11). Se mantuvieron los tiempos de extracción de las muestras (0, 21 y 35 días) y acondicionamiento de las mismas.

5.6.3.1- Extracción proteínas

Para la extracción de proteínas foliares solubles totales se utilizó un protocolo ajustado en el Laboratorio de Genética de Biotecnología de Forrajas del IGEAF (Anexo A 1.18 p157).

Se tomó una alícuota de 20 µl de sobrenadante para medir proteínas totales y el resto se conservó para evaluar los cambios en el perfil de las proteínas foliares en gel SDS-PAGE.

5.6.3.2- Cuantificación de proteínas foliares solubles totales

La concentración de proteínas foliares solubles totales de las muestras se determinó por Fluorimetría (*Quant-iT™ kit-Qubit® fluorometer-Invitrogen*) siguiendo las especificaciones técnicas del proveedor (Anexo A 1.19 p158).

5.6.3.3 - Preparación de geles SDS-PAGE para análisis de los perfiles de proteínas foliares

Los componentes utilizados para preparar los geles se indican en la Tabla 21.

Tabla 21- Componentes para la preparación de los geles de separación y concentración SDS-PAGE.

	gel Separador 4%	gel Concentrador 10%
Tris pH: 8,8	-	0,625 ml
Tris pH: 6,8	1,25 ml	-
Acril bis 30 98%	0,650 ml	1,625 ml
APS 10%	0,050 ml	0,050 ml
Temed	0,005 ml	0,005 ml
Agua HPLC	3,045 ml	2,695 ml
Volumen total	5 ml	5 ml

Para la preparación de los geles SDS-PAGE se procedió según se detalla en el Anexo A 1.20 p158.

5.6.3.4- Acondicionamiento de las muestra de proteínas y siembra de las mismas

Para acondicionar las muestras obtenidas en el punto 5.6.3.1, se tomaron 65 µl de cada una, se adicionaron 65 µl de *Buffer Loading* [2x] y se desnaturizó a 100°C por 5 minutos. El mismo procedimiento fue utilizado para acondicionar el patrón de referencia de cuantificación BSA (*Bovine serum albumin*).

Una vez acondicionadas las muestras y el patrón de referencia de cuantificación BSA, éstas fueron sembradas en los geles de SDS-PAGE, para ello se utilizaron 10 µl de cada muestra, 10 µl del marcador de peso molecular (# SM0441 de Fermenta) y 10 µl de BSA [1 µg].

Luego de la separación en geles de SDS – PAGE a voltaje constante (115 a 120 volts), durante 3 horas, se realizó la tinción con *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

5.6.3.5- Visualización por tinción con *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

El proceso de coloración se basa en la atracción electrostática del enlace peptídico de las proteínas sobre grupos de ácido sulfúrico, que son los que tiñen la proteína color azul. Asimismo, las fuerzas de Van der Waals y las interacciones hidrofóbicas participan en este proceso de unión mecánica.

5.6.3.6- Procedimiento tinción con azul brillante coomassie

Se sumergieron los geles de poliacrilamida en recipientes de vidrio que contienen la solución de trabajo azul brillante de coomassie (*Coomassie Brilliant Blue R250* 0,05%, metanol 50%, ácido acético 10%). Se dejó incubando con un suave movimiento rotatorio por 30 minutos y se retiró el colorante.

Luego se procedió a la decoloración de los geles teñidos, sumergiéndolos en la solución de decoloración (metanol 50%, ácido acético 10%) y se incubaron por 30 minutos con un suave movimiento rotatorio, se eliminó la solución decolorante y se añadió un segundo volumen de la misma solución hasta apreciar las primeras bandas. El procedimiento se repitió hasta que las bandas de las proteínas fueron apreciadas claramente.

Una vez finalizada la remoción del azul de coomassie, se descartó el decolorante usado y se lavaron los geles con una solución de glicerol al 4% (v/v). Para poder analizar los resultados es recomendable secar el gel usando un equipo secador a vacío o manualmente.

Las proteínas fijadas en el gel de poliacrilamida y teñidas de azul brillante de coomassie son observadas como bandas azules de diferentes pesos moleculares, en este caso se tomó como referencia la banda que se corresponde con la subunidad mayor de la proteína Rubisco, por ser la más abundante.

5.7- Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los experimentos de cuantificación de clorofila en el punto 5.6.2 y de proteínas solubles totales en el punto 5.6.3.2, se exploraron con un aplicativo del programa estadístico SAS (SAS 2008), para comprobar si cumplían con los supuestos (homogeneidad de varianza, independencia de los residuos y distribución

normal) para realizar un análisis de la varianza (ANOVA), con un nivel de significación del 5%. Además, se realizó un test de comparación múltiple de medias de Tukey.

Aquellos datos que no cumplieron con alguno de los supuestos del ANOVA fueron transformados de acuerdo a lo indicado por el aplicativo del programa SAS.

6- Resultados

6.1- Transformación de *A. tumefaciens* y caracterización de las colonias obtenidas

Se electroporaron células competentes de las cepas AGL1, LBA 4404 y C58C1Rif pGV2260 de *A. tumefaciens*, con los vectores binarios AtMYB32-*ipt* y AtMYB32-*gus*.

Se realizaron siembras de diluciones del cultivo de células transformadas en medios selectivos hasta obtener colonias aisladas. A partir de las mismas se realizó la extracción y cuantificación del ADN bacteriano, para luego realizar la caracterización molecular mediante PCR para confirmar la presencia de los plásmidos necesarios para la transformación genética de plantas.

6.1.1- Detección de los genes *virC*, *nptII*, *ipt* y *gusA* por PCR

Se utilizaron *primers* específicos que permiten amplificar fragmentos internos del gen *virC* localizado en el plásmido *helper* de virulencia y genes de selección *nptII* y los genes de interés *ipt* y reportero *gusA* en los vectores binarios.

Los resultados de la caracterización molecular de colonias de *A. tumefaciens* obtenidas por electroporación con los vectores binarios AtMYB32-*ipt* y AtMYB32-*gus*, se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22- Caracterización por PCR de las colonias de *A. tumefaciens* obtenidas por electroporación, con los vectores binarios AtMYB32-*ipt* y AtMYB32-*gus*.

Cepas	Colonias	<i>nptII</i>	<i>virC</i>	<i>ipt</i>	<i>gusA</i>
AGL1	AtMYB32- <i>ipt</i>	+	+	+	
	AtMYB32- <i>gus</i>	+	+		+
LBA4404	AtMYB32- <i>ipt</i>	+	+	+	
	AtMYB32- <i>gus</i>	+	+		+
C58C1RifpGV2260	AtMYB32- <i>ipt</i>	+	+	+	
	AtMYB32- <i>gus</i>	+	+		+

Se observó que todas las colonias amplificaron una banda de 730 pb y 343 pb en correspondencia con el tamaño de *virC* y *nptII* respectivamente (Figuras 12 y 13).

Estos resultados confirmaron la presencia del plásmido *helper* de virulencia y el gen de selección, fundamentales para la transformación vía *A. tumefaciens*.

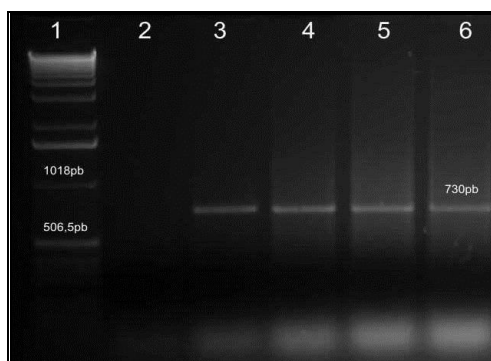


Figura 12- Detección por PCR del gen *virC* (730 pb) en colonias de *A. tumefaciens*. **1-** 1 kb ladder (Invitrogen); **2-** reacción sin ADN (mix); **3-** colonia AtMYB32-*ipt*, cepa C58C1RifpGV2260; **4-** colonia AtMYB32-*ipt*, cepa LBA4404; **5-** colonia AtMYB32-*gus*, cepa AGL1 y **6-** colonia 2 AtMYB32-*gus*, cepa LBA4404.

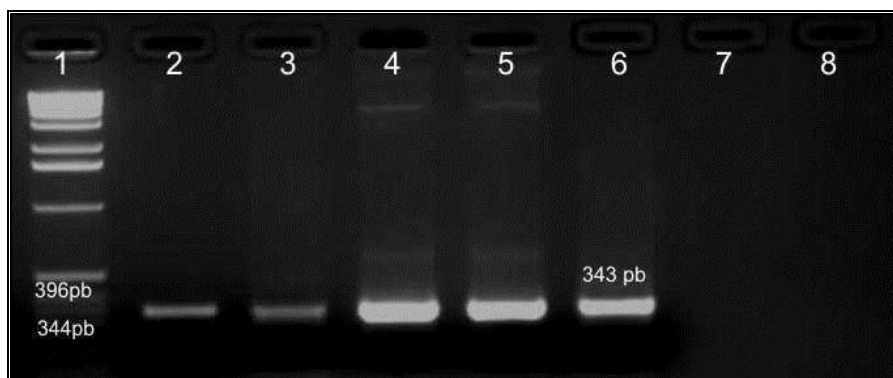


Figura 13- Detección por PCR del gen *nptII* (343 pb) en colonias de *A. tumefaciens*. **1-** 1 kb ladder (Invitrogen); **2-** colonia AtMYB32-*ipt*, cepa C58C1RifpGV2260; **3-** colonia AtMYB32-*ipt*, cepa LBA4404; **4-** colonia AtMYB32-*gus*, cepa AGL1; **5-** colonia AtMYB32-*gus*, cepa LBA4404; **6-** plásmido AtMYB32-*ipt* (control positivo); **7-** plásmido no relacionado (control negativo) y **8-** reacción sin ADN (mix).

Confirmada la presencia de los genes de virulencia y selección, se continuó con la detección de los genes de interés *ipt* (583 pb) y reportero *gusA* (1089 pb), confirmándose la presencia de los mismos (Figuras 14 y 15).

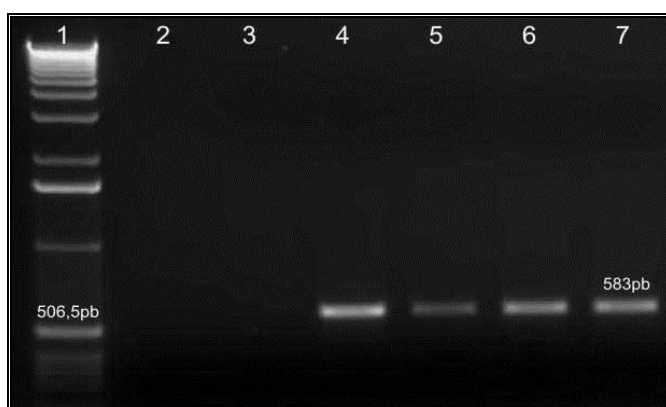


Figura 14- Detección por PCR del gen *ipt* (583 pb) en colonias de *A. tumefaciens*. **1-** 1 kb ladder (Invitrogen); **2-** reacción sin ADN (mix); **3-** plásmido no relacionado (control negativo); **4-** plásmido AtMYB32-*ipt* (control positivo); **5-** colonia 1 AtMYB32-*ipt*, cepa C58C1RifpGV2260; **6-** colonia 1 AtMYB32-*ipt*, cepa AGL1; **7-** colonia 1 AtMYB32-*ipt*, cepa LBA4404.

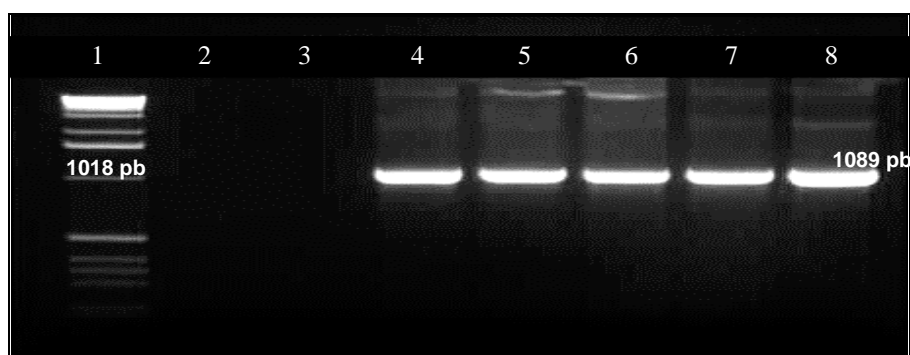


Figura 15- Detección por PCR del gen *gusA* (1089 pb) en colonias de *A. tumefaciens*. **1-** 1 kb ladder (Invitrogen); **2-** reacción sin ADN (mix); **3-** plásmido AtMYB32-*ipt* (control negativo); **4-** plásmido 35S*gus* (control positivo); **5-** colonia 1 AtMYB32-*gus*, cepa AGL1; **6-** colonia 1 AtMYB32-*gus*, cepa C58C1RifpGV2260; **7-** colonia 1 AtMYB32-*gus*, cepa LBA4404 y **8-** plásmido 35S*gus* (control positivo)

6.1.2- Digestiones del ADN plasmídico con enzimas de restricción

Continuando con la caracterización de las colonias, se realizaron digestiones con diferentes enzimas de restricción, las cuales fueron seleccionadas a partir de los mapas de restricción disponibles, para confirmar la identidad de los vectores binarios.

Los resultados de las digestiones de los vectores binarios *AtMYB32-ipt* y *AtMYB32-gus* se muestran en las Figuras 16 y 17, respectivamente.

En la digestión del ADN plasmídico de *pAtMYB32-ipt*, se observó que la enzima *Hind*III linealiza el plásmido, obteniéndose una banda del tamaño esperado (11030 pb), por otra parte la enzima *Bam*HI corta al plásmido en dos sitios, obteniéndose las dos bandas esperadas (10254 y 776 pb) (Figura 16).

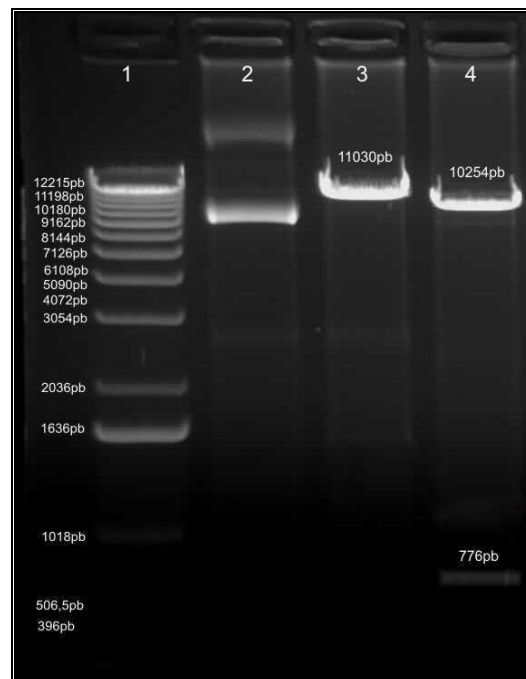


Figura 16- Digestión del vector binario *AtMYB32-ipt* con enzimas *Hind*III y *Bam*HI. **1-** 1kb ladder (Invitrogen), **2-** *pAtMYB32-ipt* sin digerir, **3-** *pAtMYB32-ipt* digerido con *Hind*III y **4-** *pAtMYB32-ipt* digerido con *Bam*HI.

En la digestión del plásmido *pAtMYB32-gus*, se observó que la enzima *Hind*III también linealiza el plásmido, obteniéndose la banda esperada (12123 pb) y la enzima *Bam*HI corta al plásmido en dos sitios, obteniéndose las dos bandas esperadas (10254 y 900 pb) (Figura 17).

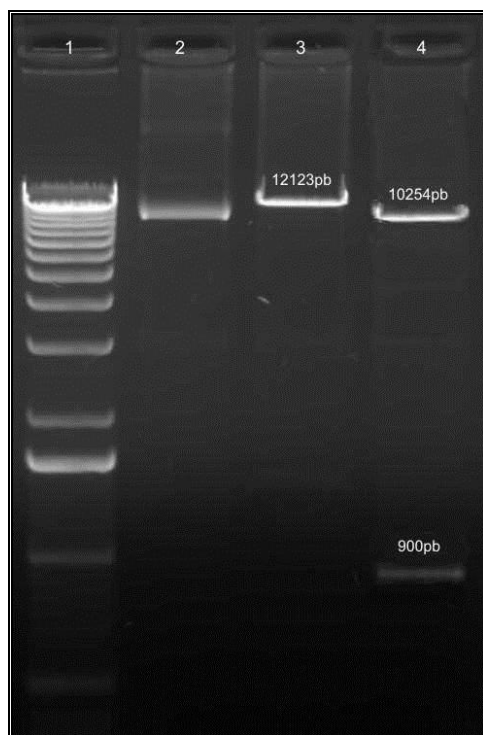


Figura 17- Digestión del vector binario AtMYB32-*gus* con enzimas *Hind*III y *Bam*HI. **1-** 1kb ladder (*Invitrogen*), **2-** pAtMYB32-*gus* sin digerir, **3-** pAtMYB32-*gus* digerido con *Hind*HI y **4-** pAtMYB32-*gus* digerido con *Bam*HI.

6.1.3- Caracterización Bioquímica – Prueba de Cetolactosa

Se realizó la caracterización bioquímica de las colonias aisladas obtenidas mediante la prueba microbiológica de Cetolactosa, específica para *Agrobacterium*.

Se presentan en la Figura 18 los resultados de la misma que se basa en la capacidad de *Agrobacterium* de utilizar lactosa como única fuente de carbono produciendo 3-cetolactosa y ésta a su vez Cu_2O , con el reactivo de Benedict. En dicha figura se observan como todas las colonias dieron el halo característico, a excepción del control negativo (*E. coli*).

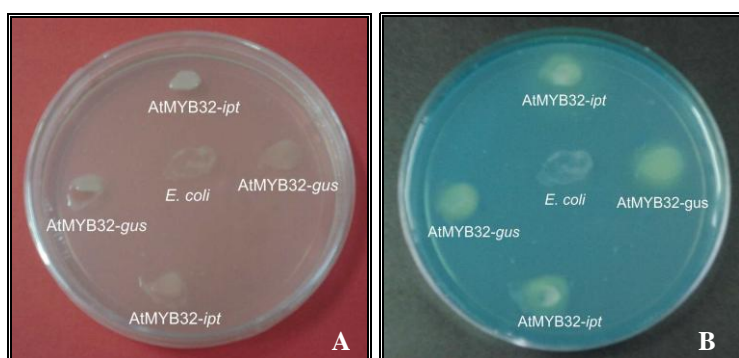


Figura 18- Prueba Cetolactosa. **A)** Colonias crecidas a 28°C, **B)** Colonias con reactivo de Benedict presencia de halo amarillento en colonias AtMYB32-*ipt* y AtMYB32-*gus*.

Teniendo en cuenta que el análisis molecular permitió corroborar la presencia tanto del plásmido *helper* de virulencia como del vector binario utilizado y por otra parte el análisis microbiológico confirmó la identidad y pureza de las colonias, éstas fueron seleccionadas para su utilización en la transformación genética de alfalfa.

6.2- Obtención de plantas transgénicas de alfalfa

Para la obtención de plantas transgénicas se utilizaron como blancos de transformación pecíolos y embriones somáticos (estado “torpedo”), teniendo en cuenta que en el Laboratorio de Biotecnología de Forrajeras del IGEAF se ha observado que estos son los que tienen mejor respuesta a la transformación (Figura 10).

A través del cultivo *in vitro* de pecíolos y embriones transformados y utilizando los medios apropiados, se indujo la formación de callos y luego embriones somáticos, a partir de los cuales se desarrollaron plantas enteras.

Estas plantas desarrolladas, pasan por un proceso de rustificación (condiciones de humedad, temperatura y luz controlada) antes de ser transferidas definitivamente a maceta en cámara de cría, para su posterior multiplicación y evaluación (Figuras 19 y 20).

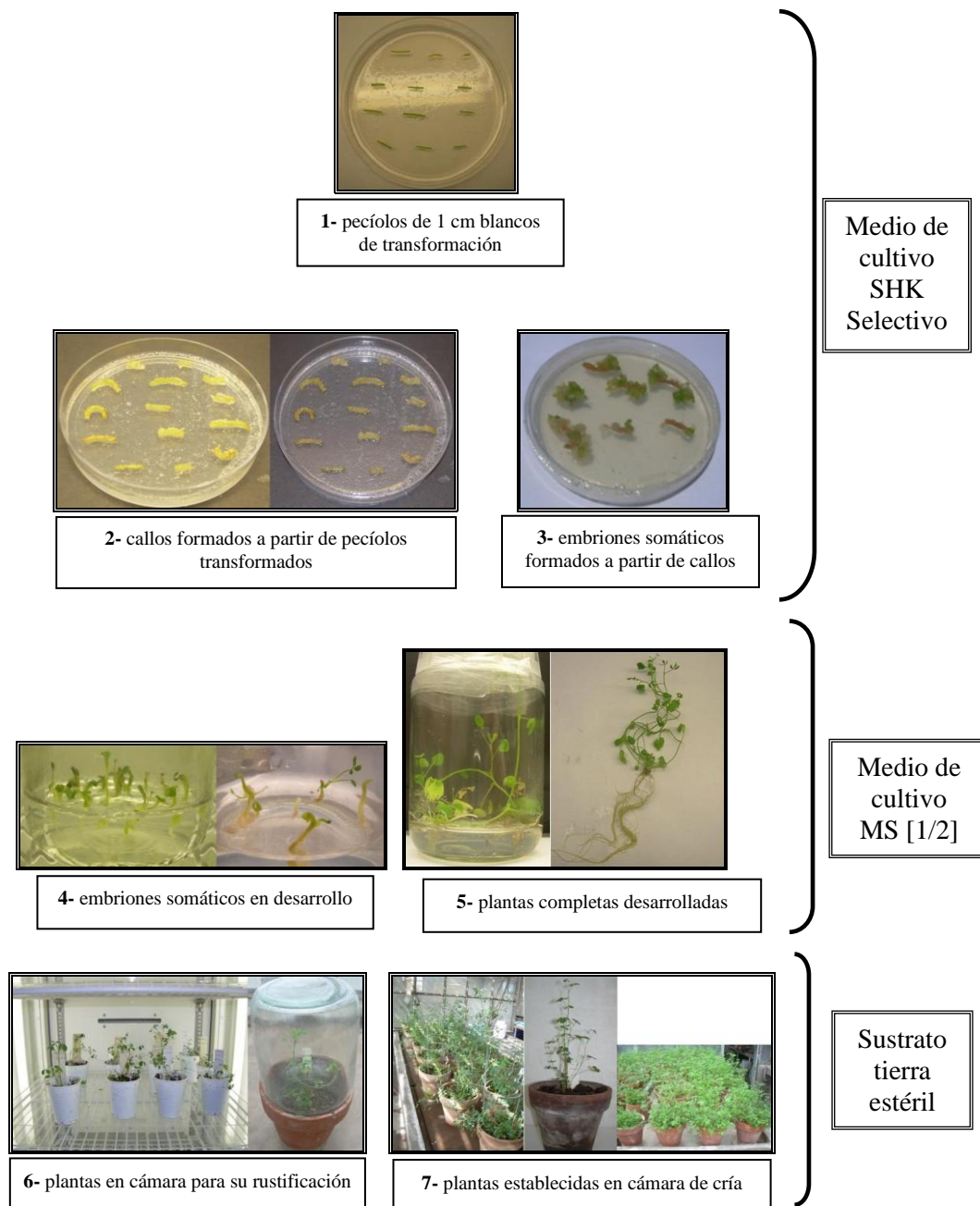


Figura 19- Esquema de transformación genética a partir de pecíolos.

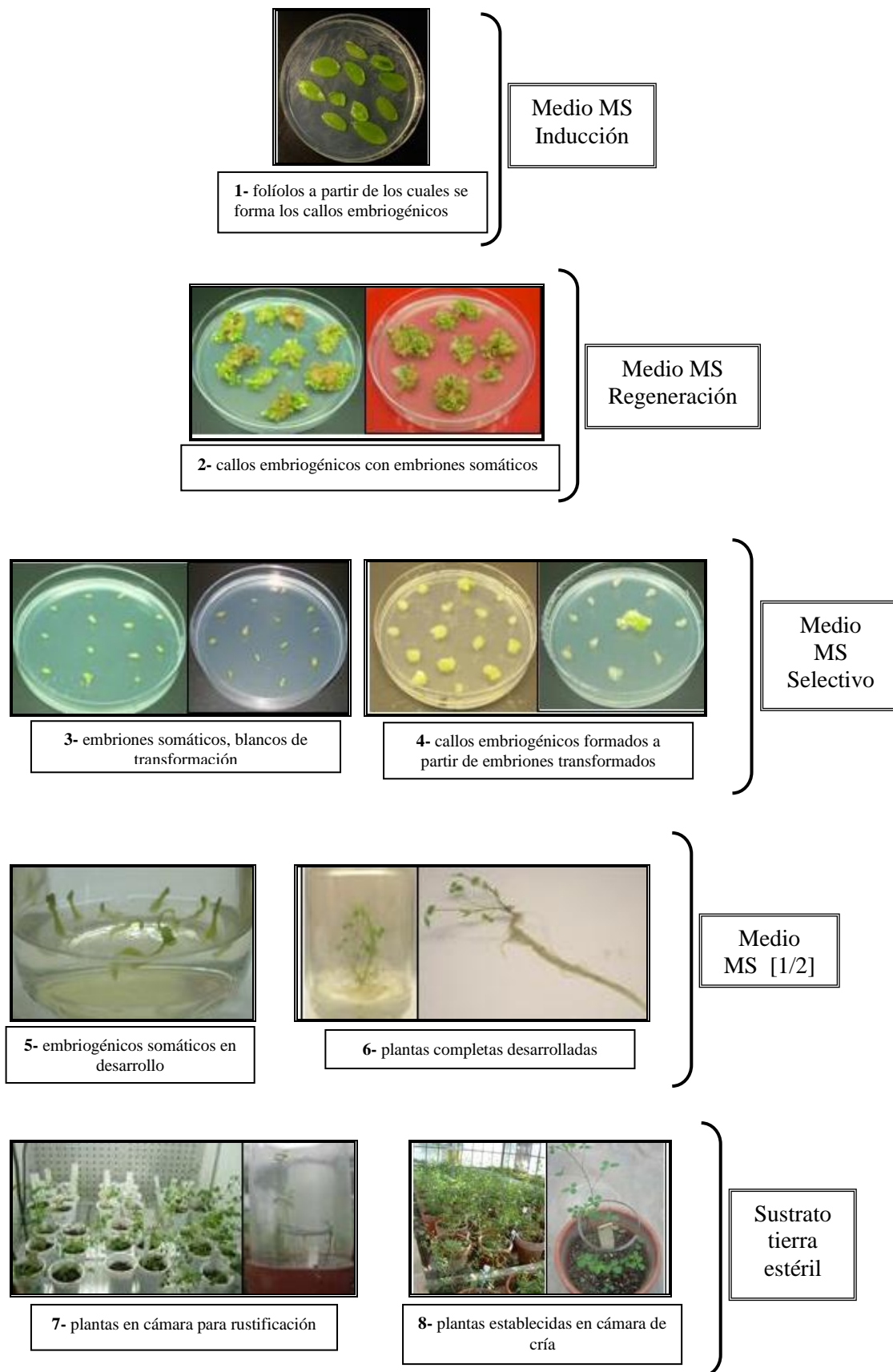


Figura 20- Esquema de transformación genética a partir de embriones somáticos.

6.2.1- Transformación genética de pecíolos y embriones somáticos con el transgen AtMYB32-*ipt*

Se realizaron 17 experimentos de transformación, que consistieron en la inoculación y cocultivo de 2480 explantes vegetales con la bacteria y su posterior cultivo *in vitro* sobre un medio que contiene el agente selectivo kanamicina (25 mg/l de kanamicina), favoreciendo el crecimiento y desarrollo de las células transgénicas. A partir de los mismos se obtuvieron 1270 callos embriogénicos, que generaron embriones somáticos y finalmente 49 plantas transgénicas, provenientes de diferentes callos, por lo cual se pueden considerar eventos independientes.

De los embriones transferidos a medio de enraizamiento, aproximadamente el 10% desarrolló en plántulas con hoja unifoliada, primera hoja trifoliada y raíces (apariciencia fenotipo normal), pero en la mayoría de los casos se produjo necrosis de raíces o desprendimiento de las mismas por malformación o no continuaron creciendo por una pérdida total de la dominancia apical (Figura 21). En consecuencia la mayor parte de plantas que se fueron produciendo no llegó a ser transferida a maceta.

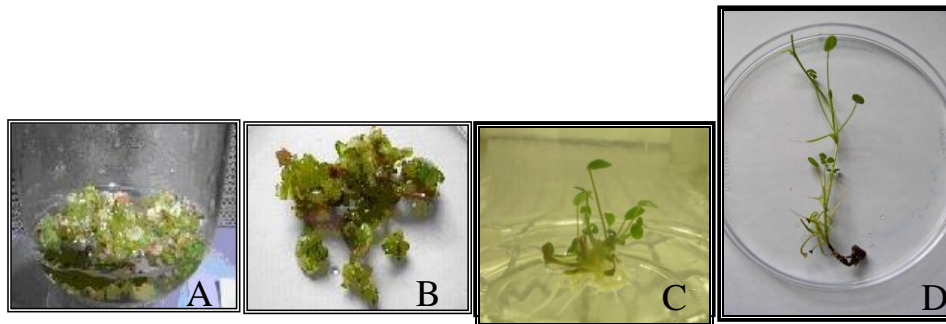


Figura 21- A y B) Embriones malformados, C) Planta anormal desarrollada a partir de embrión malformado y D) Planta anormal desarrollada sin sistema radicular y tejido necrosado.

No obstante, unas 30 plantas (en apariencia fenotipo normal) y 15 plantas (fenotipo multiramificado y folíolos pequeños) llegaron a ser transferidas pero no soportaron la etapa de rustificación.

Sólo 8 plantas soportaron la rustificación y se establecieron en maceta en cámara de cría (sene 4, sene 5, sene 6, sene 7, sene 8, sene 9, sene 10 y sene 11), aunque luego de 7 meses 3 de ellas murieron (sene 6, sene 7 y sene 8 comportándose como plantas anuales) y las restantes mostraron un crecimiento extremadamente lento, al punto tal que nos ha resultado difícil hacer estacas (Figura 22).

Se analizaron por PCR las plantas obtenidas, resultando todas positivas para los transgenes *ipt* y *nptII*, excepto las plantas sene 5, sene 9 y sene 11.

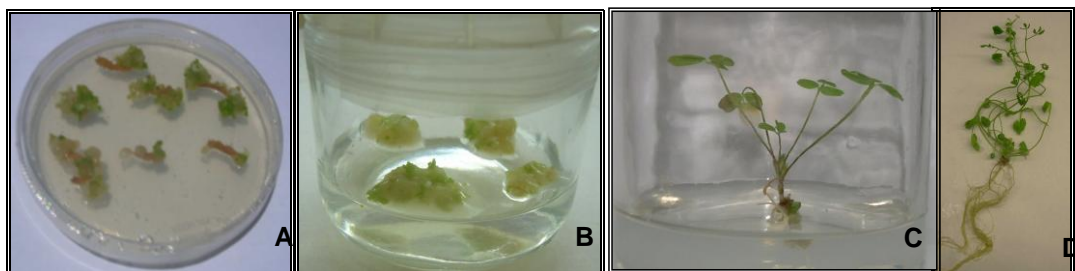


Figura 22- A) Regeneración de embriones a partir de segmentos de pecíolos transformados, B) Desarrollo de embriones en medio MS [1/2], C) Planta normal desarrollada a partir de un embrión y D) Planta normal desarrollada con buen sistema radicular, lista para ser rustificada.

Posteriormente se realizaron 4 nuevos experimentos de transformación, donde se inocularon 1020 explantes (pecíolos y embriones somáticos) y a partir de estos se obtuvieron en medio selectivo (25 mg/l de kanamicina) 290 callos embriogénicos provenientes de embriones somáticos (Figura 23) y 240 callos embriogénicos provenientes de pecíolos. A partir de los mismos se obtuvieron sólo 78 estructuras embriogénicas (se analizaron algunas de ellas y fueron PCR positivas) y se obtuvieron 3 tallos (PCR positivos) de los cuales uno enraizó y fue transferido a cámara de cría (sene 12).

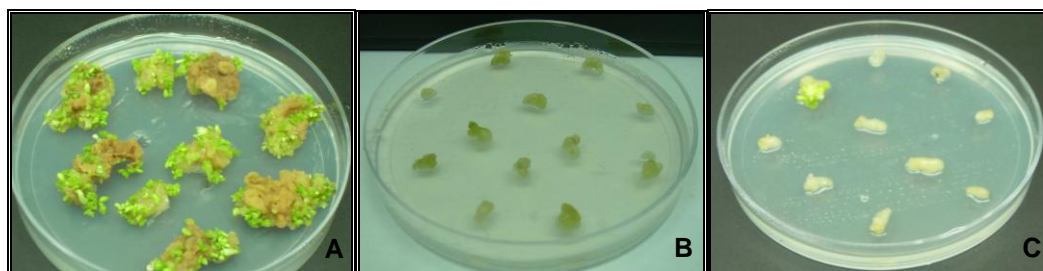


Figura 23- **A)** Regeneración de embriones a partir de folíolos para ser utilizados como blanco de transformación, **B)** Embriones transformados en medio selectivo y **C)** Regeneración de callos y embriones a partir de embriones transformados.

En algunas plantas se produjo necrosis de raíces o desprendimiento de las mismas por malformación o no continuaron creciendo por una pérdida total de la dominancia apical. En consecuencia la mayor parte de las plantas que se fueron produciendo no llegó a ser transferida a cámara de cría.

En la Tabla 23 se detallan las transformaciones realizadas, la cepa bacteriana, el transgen, el genotipo vegetal, el explante inoculado y los eventos obtenidos.

Tabla 23- Experimentos de transformación con el transgen *AtMYB32-ipt*.

Transformación	Cepas	Transgen	Genotipos	Explantes	Eventos
1	C58C1RifpGV2260	<i>AtMYB ipt</i>	C2-4	Embriones	Sene 6
					Sene 7
					Sene 8
2	C58C1RifpGV2260	<i>AtMYB ipt</i>	C2-4	Embriones	Sene 5
					Sene 9
3	C58C1RifpGV2260	<i>AtMYB ipt</i>	C2-3	Pecíolos	No
4	C58C1RifpGV2260	<i>AtMYB ipt</i>	C2-3	Pecíolos	Sene 4
					Sene 10
5	C58C1RifpGV2260	<i>AtMYB ipt</i>	C2-3	Pecíolos	Sene 11
6	C58C1RifpGV2260	<i>AtMYB ipt</i>	C2-4	Pecíolos	No
7	C58C1RifpGV2260	<i>AtMYB ipt</i>	19/17	Pecíolos	No
8	AGL1	<i>AtMYB ipt</i>	C2-3	Pecíolos	No
9	AGL1	<i>AtMYB ipt</i>	19/17	Pecíolos	No
10	AGL1	<i>AtMYB ipt</i>	C2-3	Pecíolos	No
11	AGL1	<i>AtMYB ipt</i>	C2-3	Pecíolos	No
12	AGL1	<i>AtMYB ipt</i>	19/17	Pecíolos	No

13	LBA4404	AtMYB <i>ipt</i>	C2-3	Pecíolos	No
14	LBA4404	AtMYB <i>ipt</i>	C2-4	Pecíolos	No
15	LBA4404	AtMYB <i>ipt</i>	19/17	Pecíolos	No
16	LBA4404	AtMYB <i>ipt</i>	C2-4	Pecíolos	No
17	LBA4404	AtMYB <i>ipt</i>	C2-3	Embriones	No
18	LBA4404	AtMYB <i>ipt</i>	C2-3	Pecíolos	No
19	LBA4404	AtMYB <i>ipt</i>	C2-3	Embriones	No
20	LBA4404	AtMYB <i>ipt</i>	C2-3	Embriones	No
21	AGL1	AtMYB <i>ipt</i>	C2-3	Embriones	Sene 12

Conviene señalar que la elección del genotipo vegetal a utilizar en cada experimento estuvo determinada por la disponibilidad tanto en calidad como en cantidad de material vegetal.

Como resultado del total de los 21 experimentos de transformación realizados con el transgen AtMYB32-*ipt*, se inocularon 3500 explantes, se obtuvieron 50 plantas transgénicas a partir de eventos diferentes, algunas de las cuales por PCR amplificaron las secuencias de *ipt* (gen de interés) y *nptII* (gen de selección) y solo lograron establecerse en cámara de cría 6 eventos independientes (sene 4, sene 5, sene 9, sene 10, sene 11 y sene 12), disponiéndose actualmente de sólo 3 eventos positivos de los mismos (sene 4, sene 10 y sene 12).

La eficiencia de transformación observada, es decir número de callos embriogénicos en medio selectivo/número de explantes inoculados x 100, fue superior al 50%. Si bien se obtuvo un alto número de callos embriogénicos, los embriones no presentaron una morfología definida siendo en muchos casos una masa verde. Pero si tomamos en cuenta la eficiencia de transformación considerando número de plantas obtenidas/número de explantes inoculados, esta fue de 1,5%.

Estos eventos han sido multiplicados vegetativamente por estacas y por lo tanto se dispuso de copias de cada uno de ellos.

6.2.2- Transformación de pecíolos y embriones con el transgen AtMYB32-*gus*

Se realizaron 10 experimentos de transformación utilizando pecíolos como blanco de transformación, se inocularon 263 explantes y a partir de estos se obtuvieron en medio selectivo con kanamicina 12 callos embriogénicos. La eficiencia de transformación (número de callos embriogénicos en medio selectivo/número de explantes inoculados x100) fue del 4-5%.

Los callos embriogénicos presentaron un aspecto similar a los que habitualmente se observan en transformaciones con otras construcciones utilizadas en nuestro laboratorio y fueron muy diferentes a los observados con el transgen AtMYB32-*ipt* (callo completamente verde).

Se transfirieron a medio de enraizamiento embriones somáticos los que en un 5-10 % generaron plántulas principalmente con pérdida de dominancia apical.

Se continuó con el proceso de selección *in vitro* observándose problemas en el desarrollo de la parte aérea en las plantas transgénicas.

En la Tabla 24 se detallan las transformaciones realizadas, la cepa bacteriana, el transgen, el genotipo vegetal, el explante inoculado y los eventos obtenidos.

Tabla 24- Transformaciones con el transgen AtMYB32-*gus*.

Transformación	Cepas	Transgen	Genotipos	Explantos	Evento
1	C58C1RifpGV2260	AtMYB <i>gus</i>	19-17	Pecíolos	No
2	AGL1	AtMYB <i>gus</i>	C2-3	Pecíolos	No
3	AGL1	AtMYB <i>gus</i>	19-17	Pecíolos	No
4	AGL1	AtMYB <i>gus</i>	C2-3	Pecíolos	Atgus 1
					Atgus 2
					Atgus 3
5	AGL1	AtMYB <i>gus</i>	C2-3	Pecíolos	Atgus 4
					Atgus 5
6	C58C1RifpGV2260	AtMYB <i>gus</i>	C2-3	Pecíolos	No
7	LBA4404	AtMYB <i>gus</i>	C2-4	Pecíolos	No
8	AGL1	AtMYB <i>gus</i>	C2-3	Pecíolos	No
9	AGL1	AtMYB <i>gus</i>	C2-3	Pecíolos	Atgus 6
					Atgus 7
					Atgus 8
10	AGL1	AtMYB <i>gus</i>	C2-3	Pecíolos	Atgus 9
					Atgus 10
					Atgus 11
					Atgus 12

A partir de estos 10 experimentos, fue posible obtener en total 12 eventos independientes de transformación establecidos en cámara de cría con la construcción AtMYB32-*gus*, generando estos eventos, 24 plantas.

6.2.3- Transformación de pecíolos en paralelo con las construcciones AtMYB32-*gus* y 35S*gus*

Con la finalidad de comparar el comportamiento de los promotores AtMYB32 y 35S, se realizaron 3 nuevos experimentos en los que se transformaron pecíolos en paralelo con las construcciones AtMYB32-*gus* y 35S *gus* (Tabla 25).

Tabla 25- Transformaciones en paralelo con las construcciones AtMYB32-*gus* y 35S*gus*.

Transformación	Cepas	Transgen	Genotipos	Explantos	Evento
1	AGL1	35S <i>gus</i>	19-17	Pecíolos	No
	AGL1	AtMYB <i>gus</i>	19-17	Pecíolos	No
2	LBA4404	35S <i>gus</i>	19-17	Pecíolos	No
	LBA4404	AtMYB <i>gus</i>	19-17	Pecíolos	No
3	C58C1RifpGV2260	35S <i>gus</i>	C2-3	Pecíolos	S <i>gus</i> 1
					S <i>gus</i> 2
					S <i>gus</i> 3
	C58C1RifpGV2260	AtMYB <i>gus</i>	C2-3	Pecíolos	Atgus 13
					Atgus 14

A partir de estos experimentos, fue posible obtener 2 eventos con la construcción AtMYB32-*gus* y 3 eventos con la construcción 35S-*gus*.

Se obtuvieron finalmente 2 plantas con la construcción AtMYB32-*gus* y 5 plantas con la construcción 35S-*gus*. Conviene aclarar que se obtuvieron más plantas (20) con la construcción 35S*gus*, pero no se avanzó con la rustificación de las mismas porque solo se necesitaban algunas plantas como control.

6.3- Análisis molecular de las plantas transgénicas obtenidas

Se realizaron extracciones de ADN de las plantas transgénicas obtenidas con ambas construcciones y plantas no transformadas como control, en algunos casos se tomaron las muestras de tejido vegetal antes de la rustificación de las plantas transformadas, teniendo en cuenta que un gran número de éstas se estaba muriendo.

Para establecer la calidad y cantidad de ADN de cada muestra para el análisis molecular, se utilizaron geles de agarosa al 0,8%.

En general se observó que tanto la calidad (banda no degradada), como la cantidad (banda de gran intensidad) de ADN reunieron las condiciones para ser utilizadas en las PCR (Figura 24).

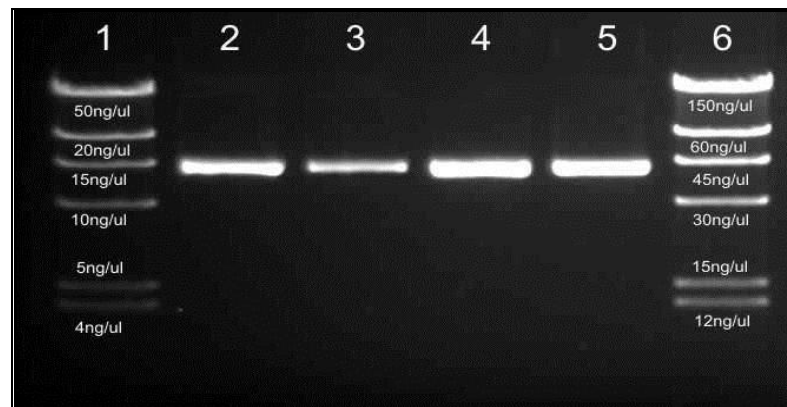


Figura 24. Cuantificación de ADN de plantas transgénicas. **1-** ADN λ *Hind*III [100 ng/ μ l]; **2-** muestra 1; **3-** muestra 2; **4-** muestra 3; **5-** muestra 4 y **6-** ADN λ *Hind*III [300 ng/ μ l].

Las concentraciones de los ADNs se obtuvieron comparando la intensidad de las bandas de las muestras con las de un patrón conocido como el ADN fago λ digerido con *Hind*III. Los resultados de dichas comparaciones fueron para el gel de la figura 24: muestra 1 [150 ng/ μ l], muestra 2 [60 ng/ μ l], muestra 3 [200 ng/ μ l] y muestra 4 [180 ng/ μ l], considerando a estos valores como aproximados.

6.3.1- Detección del transgen AtMYB32-*ipt* y AtMYB32-*gusA* por PCR

La detección de los transgenes se realizó en plantas obtenidas a partir de los experimentos de selección *in vitro* establecidas en cámara de cría. Asimismo, en algunos casos se efectuó el análisis de material vegetal durante el proceso de regeneración en medio selectivo.

La cantidad de ADN utilizado en las reacciones de PCR fue de aproximadamente 10 ng y los productos de amplificación obtenidos fueron evaluados por electroforesis en geles de agarosa.

Como control positivo de amplificación de los ADNs de alfalfa, se utilizaron *primers* de *tubulina* que permiten amplificar un fragmento interno de este gen que está presente en el genoma de la alfalfa, independientemente de su transgenicidad.

Así, se observó que todas las muestras de ADN amplificaron una banda de 550 pb, en correspondencia con la banda esperada para *tubulinas* con lo cual se pudo corroborar la amplificabilidad de las mismas y calidad de los reactivos (Figura 25).

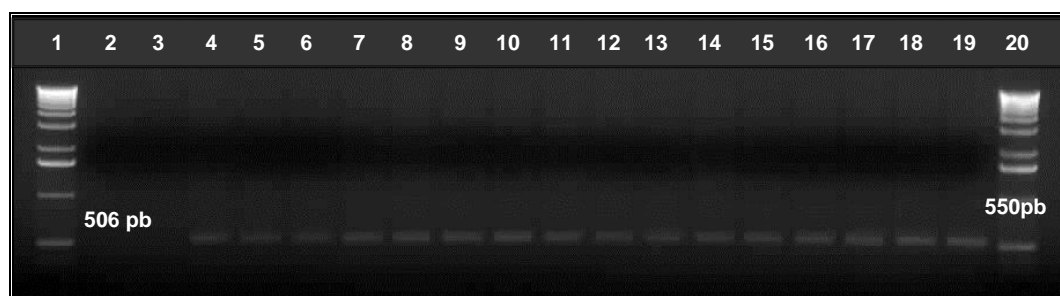


Figura 25. Detección por PCR del gen *tubulina* (550 pb) en plantas transgénicas. **1-** 1kb *ladder* (Invitrogen), **2-** reacción sin ADN (mix), **3-** plásmido (control negativo), **4-** planta no transgénica C2-3 (control positivo) (ADN C2-3), **5 al 19** plantas transgénicas y **20-** 1kb *ladder* (Invitrogen).

Una vez confirmada la amplificabilidad de los ADNs obtenidos se procedió a evaluar la transgenicidad de las plantas. Debido a que las plantas se obtuvieron en medio selectivo, se espera que las mismas contengan, por lo menos, el gen marcador seleccionable. Por ello, se inició la caracterización con los *primers* específicos para el gen *nptII*.

Se observó que el control positivo y la mayoría de las muestras amplificaron la banda correspondiente al transgen *nptII* (343 pb) y que otras muestras no amplificaron el transgen (muestras 7, 12 y 15) las cuales serían escapes, es decir, plantas regeneradas no transgénicas (Figura 26).

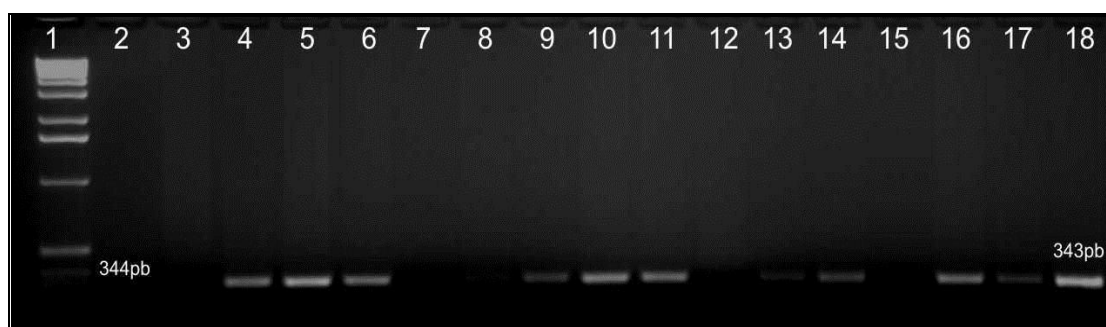


Figura 26- Detección por PCR del transgen *nptII* (343 pb) en plantas transgénicas. **1-** 1kb *ladder* (Invitrogen), **2-** reacción sin ADN (mix), **3-** planta no transgénica C2-3 (control negativo), **4-** plásmido pAtMYB32-*ipt* (control positivo) y **5 al 18** plantas transgénicas.

Posteriormente, se detectó la presencia de los transgenes *ipt* y *gusA*, utilizando los pares de *primers* correspondientes.

Se observó que el control positivo y la mayoría de la muestras amplificaron una banda de 583 pb (*ipt*) y que otras no amplificaron dicha banda (muestras 7, 9, 10, 18 y 19).

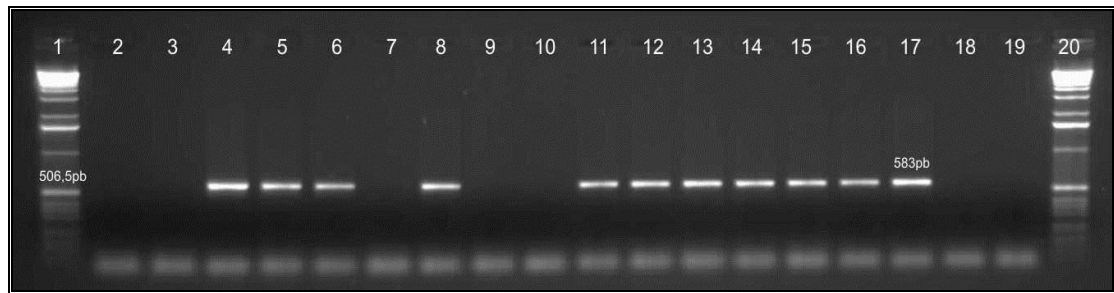


Figura 27- Detección por PCR del transgen *ipt* (583 pb) en plantas transgénicas. **1-** 1kb *ladder* (Invitrogen), **2-** reacción sin ADN (mix), **3-** planta no transgénica C2-3 (control negativo), **4-** plásmido pAtMYB32-*ipt* (control positivo), **5 al 19** plantas transgénicas y **20-** 1kb *ladder* (Invitrogen).

También se observó que las plantas obtenidas por transformación con la construcción AtMYB32-*gus*, amplificaron la banda correspondiente al transgen *gusA* (1089 pb), como así también el control positivo, confirmando la presencia del gen reportero (Figura 28).

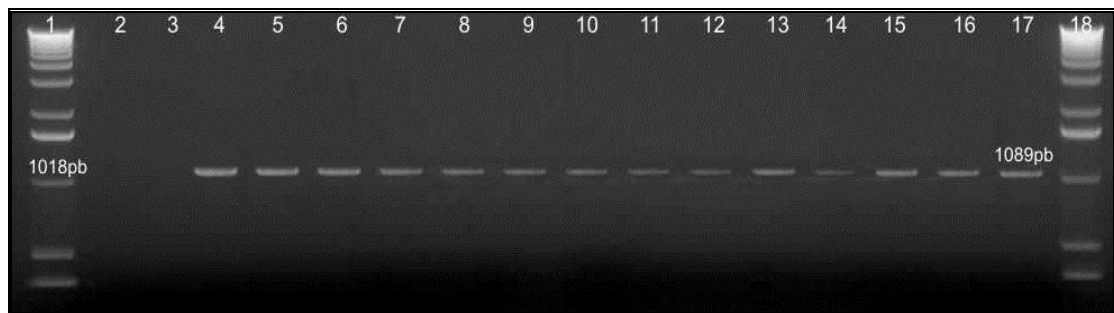


Figura 28. Detección por PCR del transgen *gusA* (1089 pb) en plantas transgénicas. **1-** 1kb *ladder* (Invitrogen), **2-** reacción sin ADN (mix), **3-** planta no transgénica C2-3 (control negativo), **4-** plásmido pAtMYB32-*gus* (control positivo) y **5 al 18** plantas transgénicas.

A través de la técnica de PCR, se pudieron detectar las plantas transgénicas que incorporaron el transgen de interés (*ipt*) y el reportero (*gusA*). Estas plantas fueron seleccionadas para continuar con los análisis correspondientes.

6.3.2- Detección de la actividad transcripcional en las plantas transgénicas AtMYB32-*ipt* por RT-PCR

Se evaluó la expresión transcripcional de las plantas transgénicas AtMYB32-*ipt* por RT-PCR. Para ello se extrajo ARN total de folíolos jóvenes de plantas transgénicas y controles no transgénicos.

Se verificó la integridad del ARN de las plantas sene 4, sene 5, sene 9, sene 10, sene 11 y sene 12, a través de un gel de agarosa 0,8% (Figura 29).

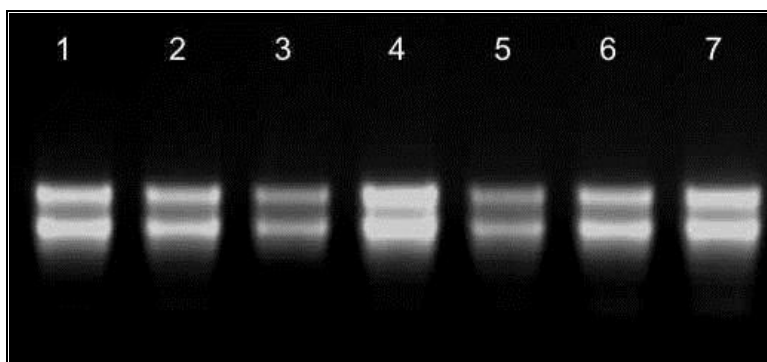


Figura 29. Verificación integridad del ARN. **1-** planta no transgénica (C2-3), **2-** sene 5, **3-** sene 9, **4-** sene 4, **5-** sene 12, **6-** sene 11 y **7-** sene 10.

Una vez verificada la integridad del ARN, se cuantificó el ARN por espectrofotometría, midiendo la absorbancia de las mismas con dos densidades ópticas (DO 260 nm y 280 nm).

Los valores de absorbancia fueron utilizados para determinar el porcentaje de contaminación, la concentración de las diferentes muestras y los volúmenes a utilizar en la reacción de digestión con ADNsa. (Ver Anexo A 2.1 p159).

Las muestras de ARN fueron tratadas con ADNasa para eliminar los restos de ADN genómico que pudieran presentar las muestras luego de la extracción, evitándose así la presencia de falsos positivos.

Para detectar la presencia de ARNm específico *AtMYB32-ipt* se siguieron las indicaciones técnicas del proveedor (*kit Ready-to-Go™ DNA Labeling Beads (-dCTP)* (GE Healthcare) *RT-PCR Beads*).

Las muestras de ARN de las plantas sene 4, sene 10 y sene 12 amplificaron una banda de 583 pb, en correspondencia con el tamaño esperado, demostrándose así la expresión del transgen *ipt* (Figura 30).

También se observó que las plantas sene 5, sene 9 y sene 11 (PCR negativas) no amplificaron bandas, confirmando que son escapes.

Por otra parte, los controles negativos de todas las plantas no amplificaron bandas, lo cual nos estaría indicando que las muestras no estaban contaminadas con ADN.

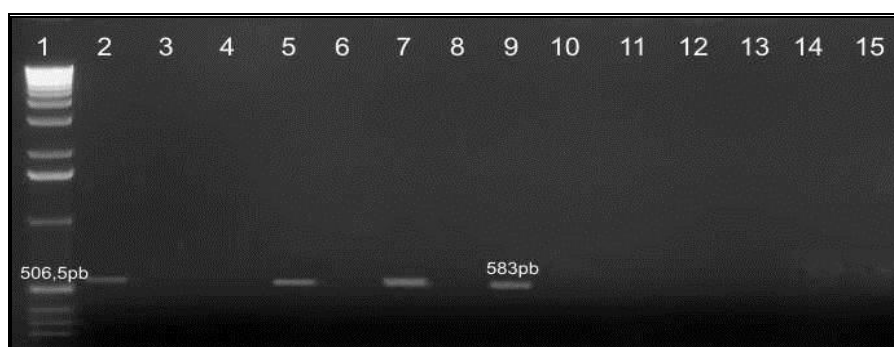


Figura 30. RT-PCR de plantas transgénicas *ipt*. **1-** 1 kb *ladder* (Invitrogen), **2-** control positivo (plásmido pAtMYB-*ipt*), **3-** planta no transgénica (C2-3), **4-** control negativo* planta no transgénica (C2-3), **5-** sene 4, **6-** control negativo* sene 4, **7-** sene 10, **8-** control negativo* sene 10, **9-** sene 12, **10-** control negativo* sene 12, **11-** sene 5, **12-** control negativo* sene 5, **13-** sene 9, **14-** control negativo* sene 9, **15-** sene 11, **16-** control negativo* sene 11 *Controles negativos (transcriptasa reversa inactivada).

Con la técnica de RT-PCR se pudo demostrar que las plantas sene 4, sene 10 y sene 12 expresan el transgen *ipt* y corroborar que sene 5, sene 9 y sene 11 son plantas que no incorporaron el transgen de interés (escapes).

6.3.3- Análisis de la integración de ADN mediante la técnica de *Southern blot*

6.3.3.1- Cuantificación ADN vegetal

Previo a la cuantificación del ADN de las muestras, éstas fueron extraídas a través de un método de macro extracción descrito en el Anexo A 1.8 p152.

Para cuantificar el ADN vegetal se utilizó un *fluorómetro Qubit® fluorometer de Invitrogen* y se procedió de acuerdo a las indicaciones técnicas del proveedor. Las concentraciones de los ADNs se muestran en el Anexo A 2.2 p159.

6.3.3.2- Síntesis de la Sonda *ipt*

Se sintetizó por PCR una sonda *ipt* a partir de los *primers* utilizados para la detección de este transgen utilizando un dNTP marcado con dioxigenina.

Las bandas amplificadas del ADN con dUTP-dig (dNTP marcado con dioxigenina) tuvieron mayor peso molecular que el control amplificado sin el dNTP modificado, confirmando su incorporación al fragmento amplificado (Figura 31).

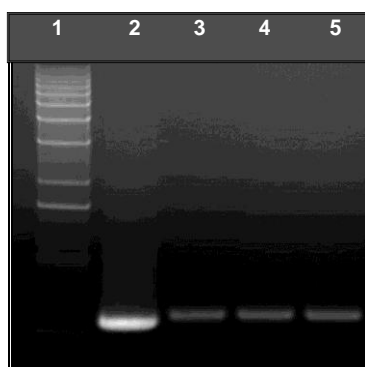


Figura 31- Producto de PCR - Síntesis de Sonda *ipt*. **1-** 1 kb ladder (Invitrogen), **2-** ADN sin marcar, **3-** ADN marcado 1° reacción, **4-** ADN marcado 2° reacción y **5-** ADN marcado 3° reacción.

Confirmado que el producto de PCR estuvo marcado, se procedió a la purificación del mismo, para su posterior cuantificación y utilización.

La purificación se realizó siguiendo las indicaciones técnicas del proveedor del *kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-up System, Promega*. Se realizaron dos eluciones de 50 µl cada una.

Para cuantificar la sonda se utilizó un *fluorómetro Qubit® fluorometer de Invitrogen*, procediendo de acuerdo a las indicaciones técnicas del proveedor del *Qubit™ Quantitation Starter Kit de Invitrogen*. Los valores obtenidos fueron los siguientes, en la primer elusión 167 ng/µl y en la segunda 25 ng/µl.

6.3.3.3- Cálculos para digestión con enzima de restricción *HindIII*

Se calcularon los volúmenes de cada muestra necesarios para las reacciones de digestión, teniendo en cuenta que se necesitan 15 µg de ADN. (Ver Anexo A 2.3 p159).

6.3.3.4- Verificación de la digestión de ADN con la enzima *HindIII*

Para verificar el resultado de las digestiones se realizó el gel que se muestra en la Figura 32, donde se ve claramente la digestión del ADN.

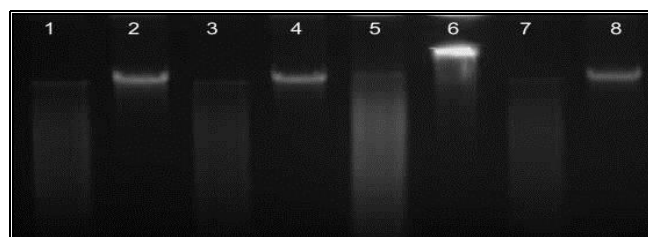


Figura 32- Verificación digestión de ADN genómico de plantas. **1-** planta no transgénica (C2-3) digerido, **2-** planta no transgénica (C2-3) sin digerir, **3-** sene 4 digerido, **4-** sene 4 sin digerir, **5-** sene 10 digerido, **6-** sene 10 sin digerir, **7-** sene 12 digerido y **8-** sene 12 sin digerir.

6.3.3.5- Observación corrida del producto de purificación de las digestiones

Una vez que se verificó la calidad de las digestiones, se procedió a la purificación de las mismas siguiendo el protocolo de purificación con cloroformo y a la preparación de un gel para sembrar dichas muestras (Figura 33).

Transcurrido el tiempo de corrida (18 h.), se observó el gel con la ayuda de un transluminador UV, para comprobar que las muestras migraron.

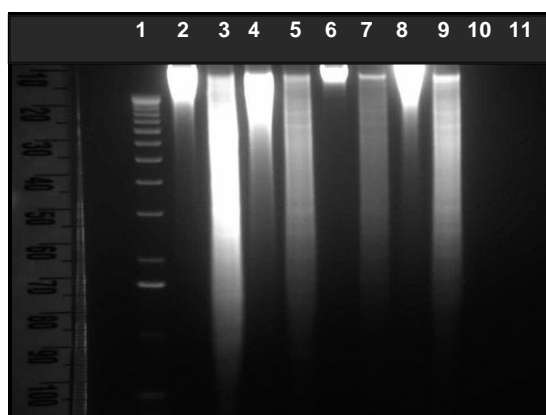


Figura 33- Corrida electroforética de ADNs digeridos y no digeridos. **1-** 1 kb *ladder* (*Invitrogen*), **2-** ADN planta no transgénica (C2-3) sin digerir, **3-** ADN planta no transgénica (C2-3) digerido, **4-** ADN sene 4 sin digerir, **5-** ADN sene 4 digerido, **6-** ADN sene 10 sin digerir, **7-** ADN sene 10 digerido, **8-** ADN sene 12 sin digerir, **9-** ADN sene 12 digerido, **10-** ADN plásmido pAtMYB *ipt* y **11-** Marcador MK III.

6.3.3.6- Transferencia

Se comprobó que la transferencia fuera completa por visualización del gel expuesto a luz UV, una vez finalizada la misma.

6.3.3.7- Hibridación molecular y Revelado

En la Figura 34 se presentan los resultados obtenidos del experimento de hibridación molecular. Nótese que no se observaron bandas en la planta no transgénica (C2-3). Se observaron bandas tanto en las plantas transgénicas (ADN digerido y no digerido) como en el ADN plasmídico utilizado como control positivo.



Figura 34- Revelado en placa radiográfica *Southern blot* de plantas *ipt*. **1-** ADN genómico sin digerir de planta no transgénica (C2-3); **2-** ADN genómico digerido de planta no transgénica (C2-3), **3-** ADN genómico sin digerir de planta transgénica sene 4; **4-** ADN genómico digerido de planta transgénica sene 4; **5-** ADN genómico sin digerir de planta transgénica sene 10; **6-** ADN genómico digerido de planta transgénica sene 10; **7-** ADN genómico sin digerir de planta transgénica sene 12; **8-** ADN genómico digerido de planta transgénica sene 12; **9-** ADN plasmídico AtMYB32-*ipt* y **10-** Marcador de peso molecular MKIII (*DNA Molecular Weight Marker III, Dioxigenin-labeled*).

6.4- Evaluación del patrón de expresión del promotor AtMYB32-*gus* en alfalfa

Se caracterizó por tinción histoquímica la expresión del transgen *gusA* en diferentes tejidos de plantas transgénicas AtMYB32-*gus*, utilizando como testigo plantas 35S-*gus* y plantas no transgénicas. Cabe aclarar que la alfalfa no transgénica no tiene expresión *gus* endógena.

6.4.1- Evaluación expresión *gus* en explantes transformados con los transgenes AtMYB32-*gus* y 35S-*gus*

A partir de las plantas obtenidas en el punto 6.2.3, se realizaron experimentos para observar los patrones de expresión mediante tinción histoquímica.

En un corte transversal de raíz de una planta transformada con el promotor 35S-*gus* se observó expresión (coloración azul) en todos los tejidos (Figura 35).

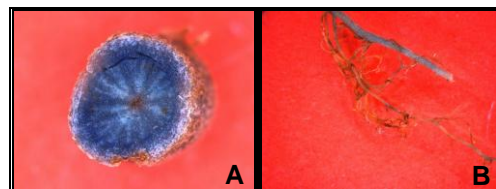


Figura 35- Tinción *gus* promotor 35S-*gus*. **A)** Corte transversal de raíz y **B)** Raíz principal y raicillas.

Sin embargo en diferentes tejidos de plantas transformadas con el promotor AtMYB32-*gus*, observamos como la expresión solo se limita a los tejidos vasculares (Figura 36).



Figura 36- Tinción *gus* promotor AtMYB32-*gus*. **A)** Estipulas, **B)** Folíolo y **C)** Raicillas.

Se observó el mismo comportamiento diferencial de los promotores en el tejido radicular y en los pecíolos (Figuras 37 y 38).

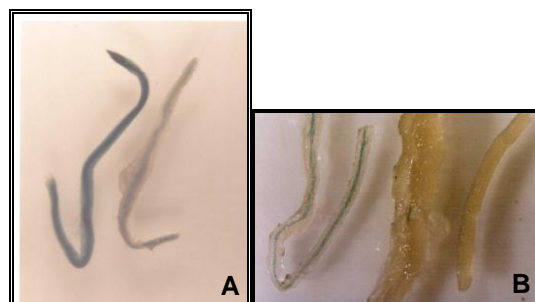


Figura 37- Comparación tinción en raíces AtMYB32-*gus* y 35S-*gus*. **A)** Izquierda 35S y derecha AtMYB32 y **B)** Izquierda AtMYB32 y derecha 35S.

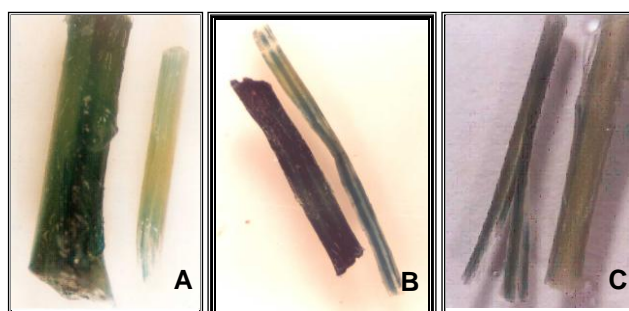


Figura 38- Comparación tinción en pecíolos AtMYB32-*gus* y 35S-*gus*. **A)** Izquierda 35S y derecha AtMYB32, **B)** Izquierda 35S y derecha AtMYB32 y **C)** Izquierda 35S y derecha AtMYB32.

Estos experimentos demostraron que las construcciones utilizadas son funcionales y que la construcción AtMYB32-*gus* se expresa principalmente en haces vasculares. Por otra parte, en los fenotipos anormales observados *in vitro* hay expresión *gus* en raíz pero no en la parte aérea.

6.5- Evaluación de la Senescencia

6.5.1- Bioensayos de hojas cortadas

Se logró ajustar un protocolo de desinfección de explantes (hojas trifoliadas), el cual se detalla a continuación.

- 1- Dejar correr 10 minutos agua corriente sobre las hojas.
- 2- Agregar 2 gotas de Triton X-100 y enjuagar 3 veces con agua destilada.
- 3- En flujo laminar sumergir las hojas en solución 0,3% de cloro activo y agitar 15 minutos a 250-300 rpm.

Enjuagar 3 veces con agua destilada estéril.

A su vez se estableció como soporte adecuado para sembrar las muestras al agar-agua 0,6 % (p/v) contenida en placas de Petri y con un fotoperíodo de 16 horas luz.

Con las condiciones de desinfección y soporte para la siembra de las muestras establecidas, se realizaron experimentos preliminares para establecer el tiempo máximo de duración de los bioensayos. En estos experimentos se estudió la senescencia de los 3 clones que usamos rutinariamente como blanco de transformación C2-3, C2-4 y 19/17 (sin transformar), utilizándose desde la 1ª hoja con sus tres folíolos abiertos desde el ápice hasta la 10ª hoja en forma correlativa y descendente de cada planta (Figuras 11 a y 11 b).

Resultados preliminares demostraron que algunas hojas de las plantas madres comenzaban a ponerse cloróticas a partir de los 15 días y que a los 35 días la totalidad de las muestras presentaban síntomas de senescencia. Se observó que el clon 19/17 inicia antes su senescencia (Figura 39). Como consecuencia, cuando se desea evaluar el comportamiento de material transgénico es importante incluir en el ensayo correspondiente los clones no transgénicos, donantes de los explantes que dieron origen a las plantas transgénicas.

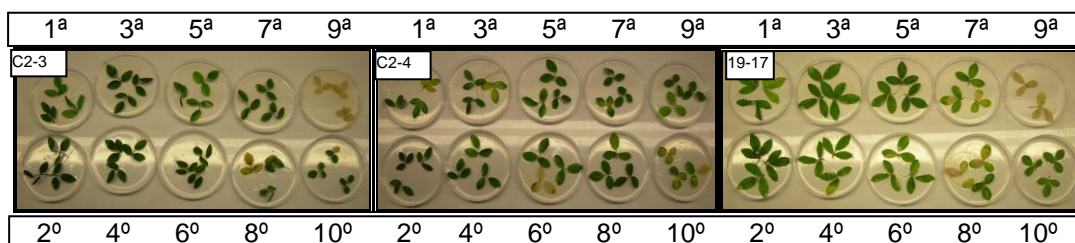


Figura 39- Plantas madres C2-3, C2-4 y 19/17, hojas desde la 1ª a la 10ª sembradas en placas de Petri con agar-agua como medio de soporte.

6.5.1.1- Bioensayos de plantas transgénicas *AtMYB32-ipt*

Se realizaron evaluaciones de senescencia de las plantas transgénicas que contenían el gen *AtMYB32-ipt*. De los análisis preliminares efectuados de los 6 eventos obtenidos, en tres de ellos (sene 4, sene 10 y sene 12) se observó una tendencia de senescencia foliar retrasada con respecto al material no transgénico C2-3 y 19/17 (Figuras 40, 41 y 42).

Cabe aclarar que las plantas sene 4, sene 10 y sene 11 se originaron a partir de pecíolos transformados y sene 12 de embriones somáticos transformados del clon C2-3. En tanto las plantas sene 5 y sene 9 se originaron a partir de embriones somáticos transformados del clon C2-4.

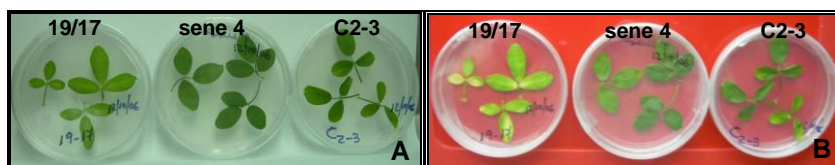


Figura 40- Hojas de planta transgénica sene 4, controles negativos C2-3 y 19/17. Hojas sembradas en placas de Petri con agar-agua como medio de soporte. **A)** A los 14 días de iniciado el ensayo y **B)** A los 28 días.

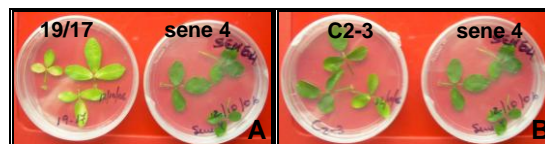


Figura 41- Hojas de planta transgénica sene 4, controles negativos C2-3 y 19/17. Hojas sembradas en placas de Petri con agar-agua como medio de soporte. **A y B)** A los 28 días de iniciado el ensayo.

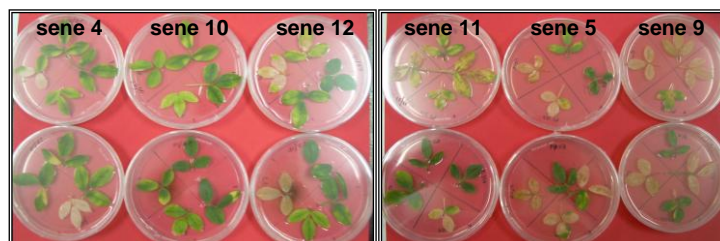


Figura 42- Hojas de plantas transgénicas sene 4, sene 5, sene 9, sene 10, sene 11 y sene 12 a los 30 días de iniciado el experimento.

Teniendo en cuenta los resultados preliminares de los bioensayos se realizaron nuevos experimentos, los cuales fueron dispuestos según lo descrito en el punto 5.6.1.1 (Figura 11 b). A partir de estos se logró cuantificar y comparar la senescencia tanto de las plantas transgénicas sene 4, sene 10 y sene 12, como la de las no transgénicas o controles negativos C2-3, sene 5, sene 9 y sene 11, a través del contenido de clorofila *a* y *b*, proteínas foliares solubles totales y observando los cambios en el perfil de proteínas foliares.

6.5.2- Cuantificación de Clorofila *a* y *b* por espectrofotometría

Las muestras se obtuvieron a partir de los folíolos izquierdos y derechos de las hojas trifoliadas de las plantas transgénicas sene 4, sene 10 y sene 12 y de las plantas control C2-3, sene 5, sene 9 y sene 11, las cuales fueron evaluadas al inicio del experimento (día 0) y al finalizar el mismo (día 35). Cada planta fue considerada como un tratamiento individual.

Los datos obtenidos fueron explorados con un aplicativo del programa estadístico SAS, para comprobar si se cumplía con los supuestos para realizar un análisis de la varianza ANOVA, con un nivel de significancia del 5%. Además se utilizó el test de comparación de medias Tukey. Los valores de las mediciones se muestran en el Anexo A 2.7 p163.

6.5.2.1- Análisis estadístico del contenido de Clorofila *a* y *b* del experimento 1 de los bloques I, II, III y IV

Al explorar los datos con el aplicativo del programa estadístico SAS, se observó que el contenido de clorofila *b* tanto al inicio (día 0), como al finalizar el experimento 1 (día 35) no cumplía con los supuestos para un análisis de Varianza, por lo que se transformaron de acuerdo con lo recomendado por el aplicativo del programa (logaritmo de base 10). Lo mismo se observó en el contenido de clorofila *a* al finalizar el mismo experimento (logaritmo de base 10).

Durante la evaluación de las plantas se observó que al inicio del experimento 1 (día 0), el contenido de clorofila *a* para todos los tratamientos no fue significativamente diferente, con un nivel de significancia del 5% (Anexo 2.7.1.1.1 p163).

Por el contrario, al inicio del mismo experimento (día 0), se observó que el contenido de clorofila *b* presentó diferencia significativa entre los tratamientos y con el test de Tukey se observó que la planta sene 12 presenta mayor contenido de clorofila *b* y se diferencia de la planta sene 9, con lo cual estamos iniciando el experimento con una diferencia significativa entre estas plantas en cuanto al contenido de clorofila *b* (Anexo 2.7.2.1.1 p168).

Al evaluar los contenidos de clorofila *a* y *b* al finalizar el experimento, se observó que los mismos fueron significativamente diferentes. Con el test de comparación de medias de Tukey para el caso de clorofila *a* se observó que sene 4 (planta transgénica) se diferencia de C2-3 (planta testigo sin transformar) y para el caso de clorofila *b* sene 10 (planta transgénica) se diferencia de la planta testigo C2-3 (Tabla 26) (Anexo 2.7.1.1.2 p164 y A 2.7.2.1.2 p170).

Tabla 26- Test de comparación de medias de Tukey, clorofila *a* y *b* a los 35 días. Experimento 1. Unidad de medida expresada en μg de clorofila/ml ($\mu\text{g} * \text{ml}^{-1}$).

Clorofila <i>a</i> (día 35)			Clorofila <i>b</i> (día 35)		
Tratamiento	Media $\mu\text{g} * \text{ml}^{-1}$	Grupo	Tratamiento	Media $\mu\text{g} * \text{ml}^{-1}$	Grupo
sene 4	4,1050	A	sene 10	3,2325	A
sene 9	4,0750	AB	sene 12	2,7738	AB
sene 10	3,9163	AB	sene 4	2,5925	AB
sene 11	3,8975	AB	sene 9	2,5138	AB
sene 12	3,2663	AB	sene 11	2,1775	AB
sene 5	3,0038	AB	sene 5	1,7475	AB
C2-3	2,4988	B	C2-3	1,6775	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Considerando que en el experimento anterior se utilizó un amplio rango de hojas (1ª a la 9ª), generando una situación en la que encontramos hojas con diferente estado ontogénico, se decidió ajustar la composición de la muestra y se planteó una nueva evaluación utilizando las hojas 6ª y 7ª, ya que dichas hojas han alcanzado su máxima expansión y presentan un estado ontogénico homogéneo.

6.5.2.2- Análisis estadístico del contenido de Clorofila *a* y *b* del experimento 2 de los bloques I y II

En este nuevo experimento, se observó que los datos correspondientes a los contenidos de clorofila *a* al finalizar el experimento no cumplían con los supuestos para un análisis de varianza, por lo cual para su análisis se transformaron mediante logaritmo de base 10. Tampoco los datos de clorofila *b*, cumplían con los supuestos y fueron transformados mediante raíz cuadrada.

Los resultados de los análisis estadísticos de este nuevo experimento mostraron que los contenidos de clorofila *a* y *b* al inicio del experimento (día 0) no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos con un nivel de significancia del 5% (Anexo 2.7.1.2 p166 y A 2.7.2.2.1 p172).

Al evaluar los contenidos de clorofila *a* y *b* al finalizar el experimento, se observó que los mismos fueron significativamente diferentes entre los tratamientos. Con el test de comparación de medias de Tukey para el caso de clorofila *a* se observó que las

plantas transgénicas sene 4, sene 12 y sene 10, así como sene 11 (planta no transgénica) se diferencian de sene 9 planta no transgénica (Figura 43 y Tabla 27 (Anexo A 2.3.1.2.2 p171 y A 2.3.2.2.2 p177)).

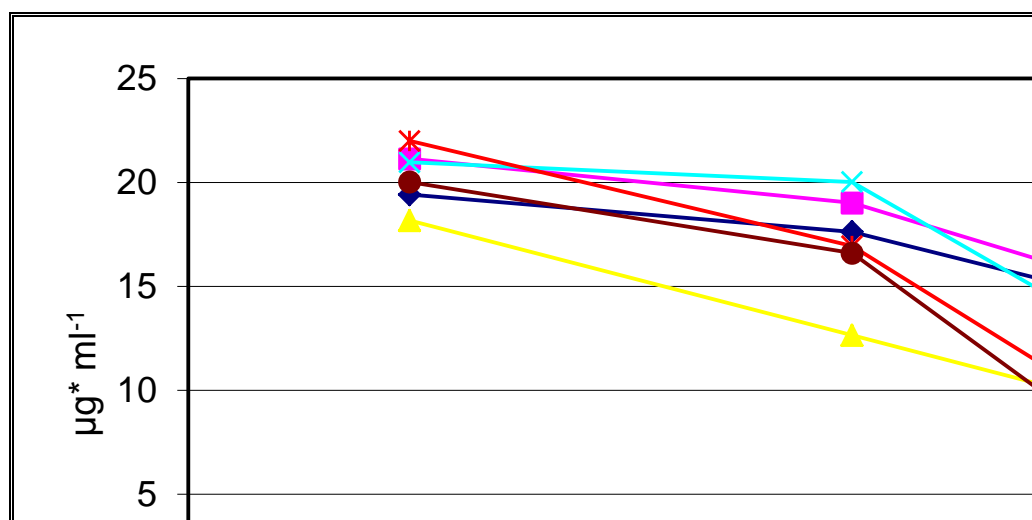


Figura 43- Concentración promedio de Clorofila *a* del experimento 2, al inicio (día 0), a los 14 días y al finalizar el experimento (día 35).

Por otra parte, si tomamos en cuenta la comparación de medias del contenido de clorofila *b* a los 35 días solo sene 4 y sene 12 (plantas transgénicas) se diferencian de la planta no transgénica sene 9 (Figura 44 y Tabla 27).

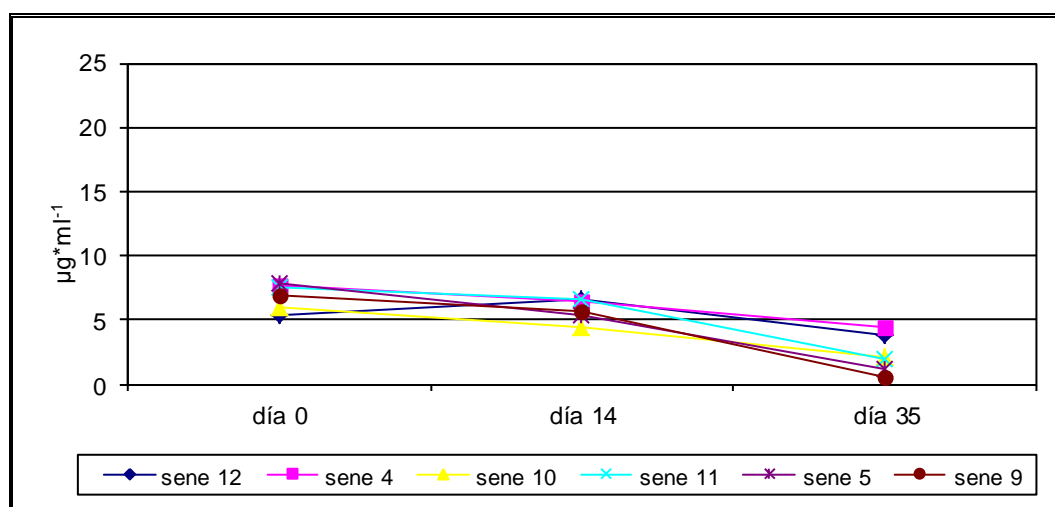


Figura 44- Concentración promedio de Clorofila *b* del experimento 2, al inicio (día 0), a los 14 días y al finalizar el experimento (día 35).

Tabla 27- Test de comparación de medias de Tukey, clorofila *a* y *b* a los 35 días. Experimento 2. Unidad de medida expresada en μg de clorofila/ml ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Clorofila <i>a</i> (día 35)			Clorofila <i>b</i> (día 35)		
Tratamiento	Media $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	Grupo	Tratamiento	Media $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	Grupo
sene 4	12,560	A	Sene 4	4,458	A
sene 12	12,288	A	Sene 12	3,860	A
sene 11	7,793	A	Sene 10	2,170	AB
sene 10	7,703	A	Sene 11	1,940	AB
sene 5	3.685	AB	Sene 5	1,108	AB
sene 9	1,025	B	Sene 9	0,550	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,5$)

Estos nuevos resultados nos muestran que al ajustar la composición de la muestra iniciamos el experimento 2 con contenidos similares de clorofila *a* y *b* en todas las plantas, que a los 35 días (final del experimento) éstas presentan contenidos estadísticamente diferentes y con el test de comparación de medias se observa un patrón que se corresponde a la situación de cada planta (transgénica o no transgénica), observándose retraso de la senescencia de las plantas que han incorporado el transgen *ipt*.

6.5.3- Cuantificación de proteínas foliares solubles totales por Fluorometría

El contenido de proteínas foliares solubles totales de las muestras de los bioensayos de senescencia se cuantificó por fluorometría utilizando el folíolo central de la hoja trifoliada.

Se analizaron muestras de plantas transgénicas sene 4, sene 10 y sene 12 y muestras de las plantas sene 5, sene 9 y sene 11 como controles negativos, considerando que estas últimas plantas son escapes que no incorporaron los transgenes (ni el gen de interés y ni el de selección) y que las mismas al igual que las plantas positivas pasaron por el proceso de transformación y cultivo *in vitro*.

A partir del protocolo de extracción de proteínas, se tomaron de cada muestra 70 μl , a partir de los cuales se alicuotaron 5 μl para medir proteínas solubles totales y los 65 μl restantes se utilizaron para observar la variación del perfil de las proteínas foliares.

6.5.3.1- Cuantificación de proteínas foliares solubles totales del experimento 1 de los bloques I, II, III y IV

Se realizaron las evaluaciones sobre las hojas de los bloques I, II, III y IV, donde se utilizaron desde 1ª a la 9ª hoja de las plantas RT-PCR positivas (sene 4, sene 10 y sene 12), de las plantas no transformadas (C2-3) y de las plantas transgénicas RT-PCR negativas (sene 5, sene 9 y sene 11). Los valores de las mediciones se muestran en el Anexo 2.8 p174).

Los datos obtenidos fueron analizados con el programa estadístico SAS, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 5% y se consideró el test de comparación de media de Tukey (Anexo A 2.8.1.1 p174 y A 2.8.1.2 p174).

Teniendo en cuenta los resultados de los análisis estadísticos podemos observar que tanto al inicio del experimento (día 0) como al final del mismo (día 35), los contenidos de proteínas foliares totales de los diferentes tratamientos no fueron significativamente diferentes (Anexo A 2.8.1.2 p174).

6.5.3.2-Cuantificación de proteínas foliares solubles totales del experimento 2 de los bloques I y II

Se realizaron las evaluaciones del nuevo experimento, con la composición de las muestras ajustada a un estado ontogénico homogéneo y de máxima expansión foliar (hojas 6ª y 7ª). Los resultados de las mediciones y el análisis estadístico se muestran en el Anexo A 2.8.2.1 p176 y A 2.8.2.2 p177).

Los resultados de los análisis estadísticos de este nuevo experimento mostraron que el contenido de proteínas solubles totales al inicio del experimento (día 0) no presentó diferencias significativas entre los tratamientos. Pero si tomamos en cuenta el contenido de proteínas a los 35 días, observamos una diferencia significativa entre tratamientos y con el test de comparación de medias encontramos que los contenidos de proteínas en las plantas sene 10, sene 4, sene 12 y sene 11 son mayores y se diferencian de la planta sene 9 (Anexo A 2.8.2.2 p177) (Tabla 28).

Tabla 28- Test de comparación de medias de Tukey, proteínas totales a los 35 días. Experimento 2. Unidad de medida mg/ml ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Proteínas totales (día 35)		
Tratamiento	Media $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	Grupo
sene 10	1,3550	A
sene 4	1,3200	A
sene 12	1,2350	A
sene 11	1,2150	A
sene 5	1,0600	AB
sene 9	0,3850	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,5$)

6.5.4- Análisis de cambios en el perfil de las proteínas foliares a través de geles SDS-PAGE 10%

La variación del perfil de las proteínas foliares durante los experimentos se analizó mediante electroforesis en geles SDS-PAGE.

La variación del perfil se observó sembrando las muestras obtenidas al inicio de los experimentos (día 0) y al finalizar los mismos (día 35), visualizando una reducción en la intensidad de las bandas (no se utilizaron las muestras de los días 14 y 21 porque las diferencias de concentraciones observadas en los geles no fueron visualmente detectable).

6.5.4.1- Análisis de cambios en el perfil de proteínas foliares del experimento 1 de los bloques I, II, III y IV

En los geles SDS-PAGE se sembraron las muestras descriptas en el punto 6.5.4, correspondientes al inicio de los experimentos (día 0) y al finalizar los mismos (día 35).

En la mayoría de los geles se observó una disminución en la intensidad de las bandas de las proteínas foliares y se consideró conveniente tomar en cuenta el cambio de intensidad de la subunidad mayor de la proteína Rubisco, porque representa el mayor porcentaje de las proteínas solubles en hoja.

En el bloque I se observó al finalizar el experimento (día 35) que las intensidades de las bandas disminuyeron, excepto sene 4 (Figura 45). Las muestras que más disminuyeron en su intensidad fueron las de las plantas utilizadas como controles negativos o testigos sene 9, sene 5, sene 11 y C2-3 (Figuras 45 y 46).

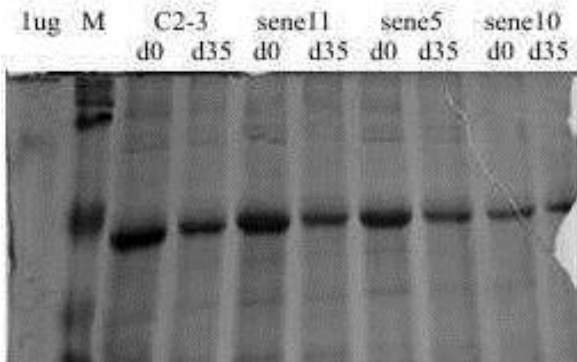


Figura 45- Perfil proteínas foliares. Experimento 1-Bloque. 1- BSA [1ug], M- Marcador peso molecular. d0- día 0, d35- día 35.

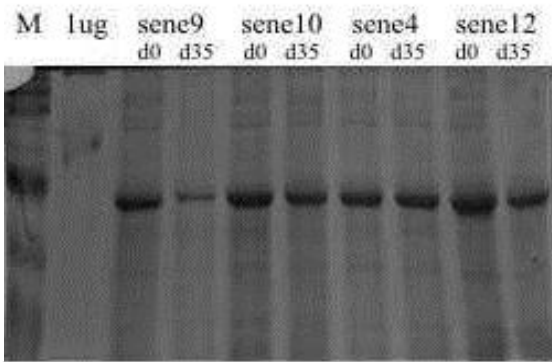


Figura 46- Perfil proteínas foliares. Experimento 1- Bloque 1- M- Marcador peso molecular, 2- BSA [1ug], d0- día 0, d35- día 35.

En el bloque II se observó que sene 12 fue la única planta transgénica que no disminuyo su intensidad a los 35 días, con respecto a las plantas testigos sene 9 y 11 tuvieron un comportamiento similar (Figura 48).

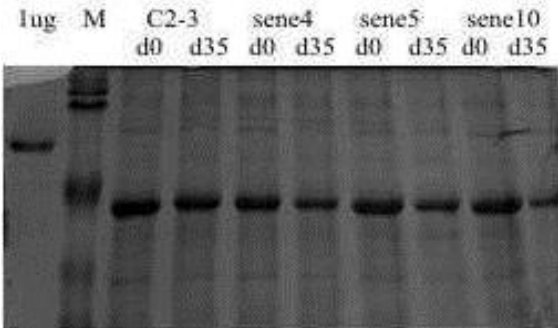


Figura 47- Perfil proteínas foliares. Experimento 1-Bloque II. 1- BSA [1ug], M- Marcador peso molecular. d0- día 0, d35- día 35.

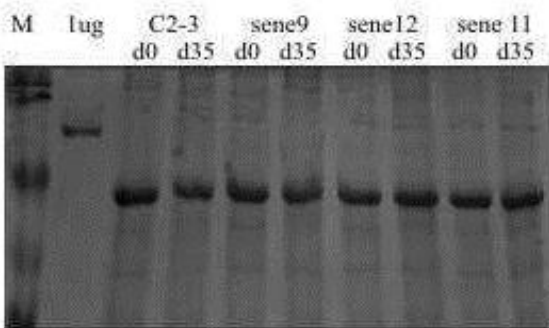


Figura 48- Perfil proteínas foliares. Experimento 1-Bloque II. 1- Marcador peso molecular, 2- BSA [1ug], d0- día 0, d35- día 35.

En el bloque III se observó que las plantas transgénicas sene 4 y 12 no presentaron variaciones en las intensidades de las bandas al final del experimento (35 días), comportamiento similar se observó nuevamente en las plantas testigos sene 9 y 11 (Figura 49 y 50).

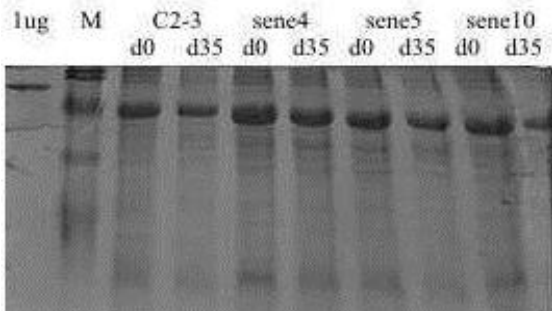


Figura 49- Perfil proteínas foliares. Experimento 1-Bloque III. 1- BSA [1ug], M- Marcador peso molecular, d0- día 0, d35- día 35.

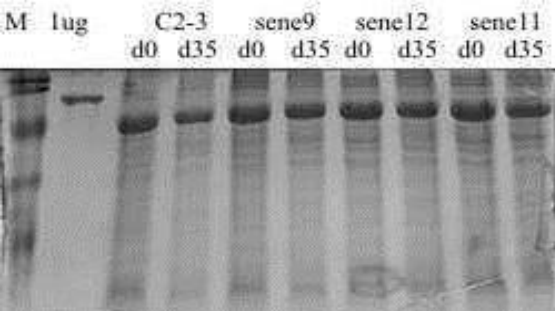


Figura 50- Perfil proteínas foliares. Experimento 1- Bloque III M- Marcador peso molecular, 2- BSA [1ug], d0- día 0, d35- día 35.

En el bloque IV se observó nuevamente que sene 4 y 12 no presentaron variaciones en las intensidades de las bandas de proteínas al final del experimento (día 35), se observa también que sene 9 y 11 casi no disminuyeron en gran proporción sus intensidades de bandas. (Figura 51 y 52).

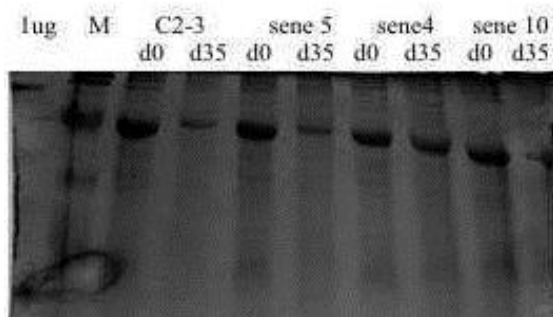


Figura 51- Perfil proteínas foliares. Experimento 1-Bloque IV. 1- BSA [1ug], 2- Marcador peso molecular, d0- día 0, d35- día 35.

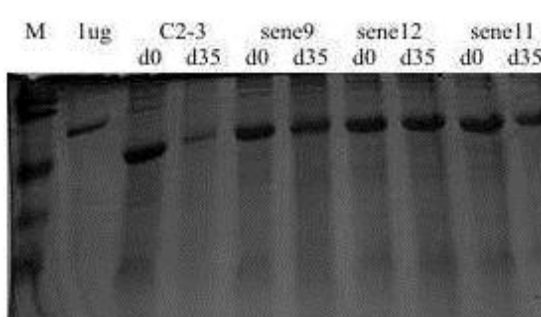


Figura 52- Perfil proteínas foliares. Experimento 1-Bloque IV. M- Marcador peso molecular, 2- BSA [1ug], d0- día 0, d35- día 35.

Teniendo en cuenta los resultados de las evaluaciones anteriores, podemos decir que se evidenció un retraso en la degradación de las proteínas en las muestras de las plantas transgénicas 4 y 12 en la mayoría de los bloques, si las comparamos con la planta control negativa C2-3.

6.5.4.2- Análisis de cambios en el perfil de las proteínas foliares del experimento 2 de los bloques I y II

En este nuevo experimento se ajustó la composición de las muestras, partiendo de un mismo estado ontogénico (6^a a 7^a hoja), para intentar corregir las diferencias en la concentración inicial de proteínas de las muestras.

En el bloque I del nuevo experimento, se observó que la intensidad inicial de las bandas de proteínas foliares es similar en todas las muestras, mientras que al finalizar el mismo (día 35) se observó que las plantas transgénicas sene 4, 12 y 10 disminuyeron en menor medida. (Figura 53).

En la muestra sene 9 a los 35 días no se observaron bandas, lo cual no significa la degradación total de las proteínas, porque si tomamos en cuenta los valores de medición de proteínas totales (0,45 mg/ml), la ausencia de bandas se justifica sobre la base de la capacidad de detección del sistema analítico utilizado (Figura 54).

Al comparar las plantas transgénicas entre sí, también se observó diferencias en las intensidades de las bandas al finalizar el ensayo, destacándose entre estas la planta sene 4 por su mayor intensidad.

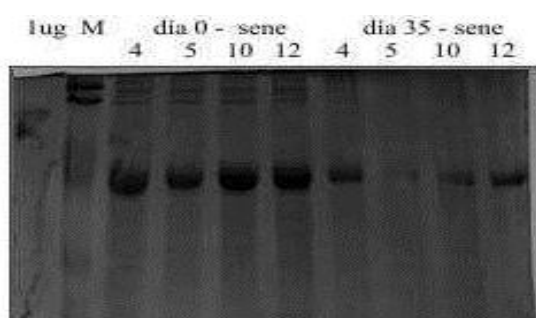


Figura 53- Perfil proteínas foliares. Experimento 2-Bloque I. 1- BSA [1ug], M- Marcador peso molecular.

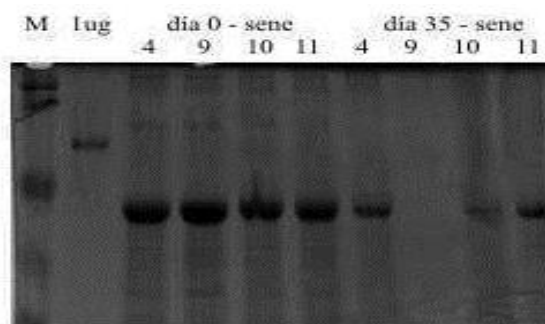


Figura 54- Perfil proteínas foliares. Experimento 2- Bloque I. M- Marcador peso molecular 2- BSA [1ug]

En el bloque II también se observó el mismo comportamiento del bloque anterior, donde las plantas transgénicas son las que menos disminuyen su intensidad de banda (Figuras 55 y 56).

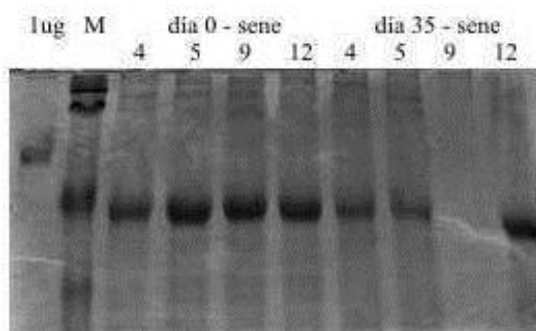


Figura 55- Perfil proteínas foliares. Experimento 2-Bloque II.
1- BSA [1ug], M- Marcador peso molecular.

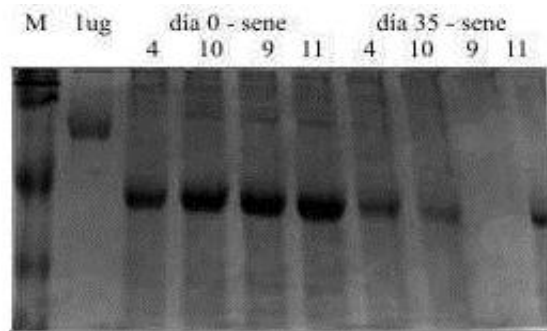


Figura 56- Perfil proteínas foliares. Experimento 2-Bloque II.
M- Marcador peso molecular, 2- BSA [1ug].

Estos resultados también nos estarían indicando que existe una tendencia en el retraso de la degradación de las proteínas foliares, y en estos casos específicos, comparando la intensidad de las bandas de la subunidad mayor de la proteína Rubisco en las plantas transgénicas que incorporaron el transgen *ipt*.

Discusión

En plantas forrajeras como la alfalfa, la senescencia foliar produce tanto una pérdida de forraje como una reducción de la calidad del mismo. El mejoramiento genético de la calidad del forraje constituye uno de los mecanismos más económicos y eficientes para el mejoramiento de la performance animal (Casler and Kaeppler 2001). El retraso de la senescencia podría generar un cambio significativo en los valores de los parámetros que determinan la calidad del forraje, teniendo en cuenta que si bien es difícil establecer la magnitud de esos cambios (Casler and Vogel 1999) se ha indicado que un 1% de incremento en la digestibilidad *in vitro* de la materia seca permite un incremento promedio de 3,2% en la ganancia de peso por animal. Bajo esa consideración, la manipulación de la senescencia constituye un objetivo particularmente atractivo para este grupo de especies.

La senescencia es un proceso altamente regulado en el cual algunas vías metabólicas se activan y otras se desactivan. Así, en varias especies vegetales se han clonado genes que se expresan durante la senescencia foliar y se los reconoce con la denominación genérica de SAGs (Senescence Associated Genes). Es notoria la presencia entre los mismos de genes que codifican para enzimas proteolíticas y otros componentes del aparato de degradación de proteínas. La senescencia esta regulada básicamente por las hormonas vegetales. Así, el etileno actúa como promotor de la senescencia mientras que las citoquininas se comportan como antagonistas de la misma. En consecuencia, altos niveles de citoquininas producen un retraso de la senescencia.

Con el desarrollo de la Ingeniería Genética surgió la posibilidad de abordar en forma novedosa el estudio de la senescencia en plantas mediante la manipulación de la producción endógena de citoquininas. Cabe destacar, que esta aproximación experimental no sufre de las limitaciones observadas en estudios clásicos donde las aplicaciones exógenas de citoquininas se ven afectadas por la absorción, transporte y catabolismo de las mismas.

En este contexto, varios grupos han utilizado el gen *ipt*, aislado de *A. tumefaciens*, que codifica para la enzima *isopentenil transferasa*. Cabe mencionar que el paso catalizado por la isopentenil transferasa es considerado como limitante de la síntesis de citoquininas en plantas (Crozier *et al.* 2000).

La secuencia codificante de *ipt* ha sido expresada en plantas transgénicas bajo control de promotores constitutivos, tejido-específicos e inducibles.

En este trabajo se utilizó el transgen MYB 32-*ipt* que contiene la secuencia codificante *ipt* bajo control del promotor MYB 32. Éste proviene del gen MYB 32 de *A. thaliana*, miembro de la familia de los genes MYB que codifican para factores de transcripción que tienen como función coordinar la expresión de conjuntos de genes durante el desarrollo (Li and Parish 1995). Su producto contiene dominios de unión al ADN típicos de genes MYB con repeticiones R2 y R3 exclusivas de plantas y un posible dominio activador (Martin and Paz Ares 1997; Li *et al.* 1999).

La expresión de los genes nucleares eucarióticos está controlada en varios niveles que involucran la transcripción propiamente dicha, el procesamiento, transporte y estabilidad de los transcriptos y su traducibilidad así como la estabilidad, modificación y compartimentalización del producto proteico final. Existen, por lo tanto, varias alternativas para controlar el nivel de expresión de un transgen nuclear en una especie particular. Sin embargo, cabe mencionar que el nivel primario de control de la expresión génica en la célula es el transcripcional.

En los experimentos de transformación genética de este trabajo se utilizaron las cepas de *A. tumefaciens* C58C1RifpGV2260, LBA4404 y AGL1, cepas que demostraron aptitud para la transformación de alfalfa en experimentos anteriores realizados en el Laboratorio de Biotecnología de Forrajas del IGEAF. Previo a la transformación vegetal se puso particular atención en la caracterización de las colonias *A. tumefaciens* (digestiones enzimáticas, PCR, prueba de la cetolactosa) que luego fueron utilizadas en los experimentos de transformación para evitar contaminaciones que pudieran distorsionar los resultados y asegurar la presencia de todos los elementos estructurales necesarios para la transformación genética de plantas.

En los experimentos de transformación realizados con el vector binario AtMYB32-*ipt*, se inocularon en total 3500 explantes (pecíolos y embriones somáticos), a partir de los cuales se generaron 1800 callos embriogénicos, de estos callos se lograron regenerar 50 plantas (eventos independientes), que por PCR 47 plantas amplificaron las secuencias de *ipt* (gen de interés) y *nptII* (gen de selección). Solo lograron establecerse en cámara de cría 9 plantas o eventos independientes (sene 4, sene 10, sene 12 como plantas transgénicas, sene 5, sene 9, sene 11 como escapes y sene 6, sene 7, sene 8 murieron a los 7 meses). Por otra parte, se obtuvo utilizando el sistema de selección *nptII*/kanamicina con el vector binario AtMYB32-*ipt*, una alta eficiencia de transformación, superior al 50% (callos embriogénicos en medio selectivo/explantes inoculados x 100), considerando la eficiencia del 10% observada habitualmente en el Laboratorio de Biotecnología de Forrajas del IGEAF y a la eficiencia del 30% (para pecíolos transformados) y 8% (para embriones transformados) observada por Soto (2004), considerando el mismo sistema de selección y los mismos clones de alfalfa. Sin embargo, si bien se obtuvo un alto número de callos embriogénicos los embriones no presentaron una morfología definida siendo en muchos casos una masa verde. Por ello, si consideramos a la eficiencia de transformación teniendo en cuenta el número de plantas regeneradas en medio selectivo con relación a los explantes inoculados, esta fue muy baja (1,5%).

En cuanto a la eficiencia de transformación obtenida con vector binario AtMYB32-*gus* (4 a 5%), fue baja si consideramos los valores antes descriptos.

De los embriones (AtMYB-*ipt*) transferidos a medio de enraizamiento, aproximadamente el 10% desarrolló en plántulas con hoja unifoliada, primera hoja trifoliada y raíces (apariencia fenotipo normal) (Figura 22), pero en la mayoría de los casos se produjo necrosis de raíces o desprendimiento de las mismas por malformación o no continuaron creciendo por una pérdida total de la dominancia apical (Figura 21). Esto fue observado principalmente en el desarrollo de las plantas transgénicas durante la etapa *in vitro*, pero también se observaron dificultades en la etapa de rusticación.

Está muy estudiado que las citoquininas endógenas juegan un rol determinante dentro de procesos fisiológicos, metabólicos y de desarrollo de las plantas superiores, como son la división celular y el crecimiento de las células, el desarrollo de los cloroplastos, la diferenciación celular y la senescencia (Kende 1971; Skoog and Armstrong 1970).

Desafortunadamente, como ya ha sido estudiado, las diferentes citoquininas participan activamente de un amplio rango de funciones, y debido a ello es que su sobreexpresión no solo retrasa la senescencia de las hojas sino que además tiene un impacto notable en diferentes aspectos de la fisiología y la morfología de dichas plantas. Así, plantas de tabaco que expresaron constitutivamente el gen *ipt* de *A. tumefaciens* y niveles elevados de citoquininas, difícilmente lograron formar raíces (Schmülling *et al.*

1989), además de tener alterado su hábito de crecimiento y fertilidad (Medford *et al.* 1989; Smart *et al.* 1991; Li *et al.* 1992).

Resultados similares fueron observados en plantas transgénicas de trébol blanco obtenidas con el mismo vector binario AtMYB332-*ipt* (Lin 2000), así como las reportadas para otras especies que contenían transgenes con la secuencia codificante *ipt* bajo control de otros promotores (Groot *et al.* 1995; Smigocki 1991; Medford *et al.* 1989; Smigocki and Owens 1988). En forma general se indica que las plantas que sobreexpresan el gen *ipt* bajo el control de varios promotores a menudo exhiben reducida dominancia apical, retraso en el crecimiento de raíces y variaciones a nivel fenotipo.

En otros trabajos, para superar esta limitación y poder obtener plantas completas se han utilizado promotores inducibles (se mencionan algunos ejemplos: shock térmico, Medford *et al.* 1989; heridas, Smigocki *et al.* 1993; luz, Thomas *et al.* 1995) y aplicación de IBA al medio de enraizamiento (Ma and Liu 2009). Si bien el uso de estos promotores permitió un mayor control en la expresión del transgen *ipt*, en muchos casos éste no resultó satisfactorio.

En investigaciones sobre la expresión regulada del gen *ipt*, Gan and Amasino (1995) obtuvieron plantas transgénicas de tabaco, en las que la secuencia codificante *ipt* se hallaba bajo control del promotor SAG12 de *A. thaliana*. Las plantas transgénicas obtenidas no presentaron alteraciones morfológicas y mostraron un importante retraso en la senescencia foliar. Sin embargo, en esta misma especie se observó que al activarse el gen *ipt* regulado por el promotor SAG12 al inicio de la senescencia, las hojas basales presentaron un retraso de la misma, mientras que las hojas jóvenes mostraron una deficiencia de nutrientes (Jordi *et al.* 2000) y una reducción de establecimiento de plántulas en respuesta a estrés hídrico (Cowan *et al.* 2005). En lechuga observaron senescencia prematura en hojas superiores, además de confirmar los resultados observados en tabaco (Matthew *et al.* 2001).

La estrategia de utilizar el gen *ipt* bajo el control del promotor SAG12 mostrada por Gan and Amasino (1995), resultaba en la biosíntesis y acumulación de citoquininas exclusivamente en las hojas senescentes de las plantas transgénicas. Esto tenía además otra consecuencia, ante la desaparición de los síntomas de senescencia, el promotor SAG12 dejaba de ser funcional y con ello cesaba la expresión del gen *ipt*, con la consecuente disminución de la biosíntesis de citoquininas, lográndose así una producción autorregulada de citoquininas, lo que no solo permitió retrasar la senescencia en hojas, sino que además evitó las aberraciones morfológicas resultantes de la producción inespecífica del regulador de crecimiento.

En forrajeras hay escasos antecedentes sobre investigaciones de promotores no constitutivos con la secuencia codificante *ipt*. Ludlow *et al.* (2000), comunicaron la obtención de plantas transgénicas de trébol blanco que expresaban la secuencia codificante *ipt* ya sea bajo el control de los promotores de *A. thaliana* SAG12 o AtMYB 32. Utilizando ambas construcciones se observaron plantas con un rango de fenotipos de normal a totalmente anormal y senescencia foliar retrasada. Sandman *et al.* (2003) han comunicado la expresión de la construcción SAG12-*ipt* en plantas transgénicas de alfalfa, pero posteriormente no se han detectado nuevas publicaciones con resultados avanzados del comportamiento agronómico superior expresado en los eventos transgénicos obtenidos. Calderini *et al.* (2007) lograron retrasar la senescencia en alfalfa utilizando la misma construcción (SAG12-*ipt*), obteniendo plantas transgénicas con fenotipo normal, aunque no mostraron el patrón de expresión de este promotor.

En ese sentido en el presente trabajo, con la finalidad de observar el patrón de expresión *gus* en plantas obtenidas con las construcciones AtMYB32-*gus* y 35S-*gus*, se realizaron 13 experimentos en los que se transformaron pecíolos, de los cuales, 3 fueron en paralelo. A partir de estos experimentos fue posible obtener 14 eventos independientes de transformación establecidos en cámara de cría con la construcción AtMYB32-*gus* y 3 eventos con la 35S-*gus*.

Como resultado de estas transformaciones se obtuvieron 26 plantas con la construcción AtMYB32-*gus* y 5 plantas con la construcción 35S-*gus*. Cabe recordar que se obtuvo un mayor número de plantas con la construcción 35S-*gus*, pero no se avanzó en su rustificación porque solo se necesitaban algunas plantas como control.

Los callos embriogénicos presentaron un aspecto similar a los que habitualmente se observan en transformaciones con otras construcciones utilizadas en el laboratorio y fueron muy diferentes a los observados con el vector binario AtMYB32-*ipt* (callo completamente verde - Figuras 21 y 22), pero al ser transferidos a medio de enraizamiento estos embriones somáticos, también generaron un bajo número de plántulas y principalmente con pérdida de dominancia apical. Al continuar con el proceso de selección *in vitro* se observaron problemas en el desarrollo de la parte aérea en las plantas transgénicas, en una frecuencia muy superior a lo observado habitualmente en nuestro laboratorio.

Los resultados moleculares confirman la transgenicidad de las plantas obtenidas. El análisis por PCR que se efectuó sobre las plantas transgénicas obtenidas, permitió poner en evidencia la estabilidad estructural de los eventos analizados, particularmente la integridad de los transgenes *ipt* y *gusA* (Figuras 27 y 28).

Es de notar que en nuestros experimentos se observaron escapes, es decir, plantas regeneradas no transgénicas (hecho confirmado con las técnicas de PCR y RT-PCR). Esto no coincide con la experiencia obtenida en el Laboratorio de Biotecnología de Forrajeras del IGEAF, confirmando la eficiencia de la selección *in vitro* practicada (Rios y col. 2007), siempre que se consideren los resultados de los análisis de PCR del material vegetal que se encontraba en selección y/o rustificación.

Para la evaluación de la actividad transcripcional de las plantas transgénicas AtMYB32-*ipt* se utilizó un kit comercial utilizado por Chen *et al.* (2001) en la detección del transgen *ipt* en *Brassica oleracea* y por Calderini *et al.* (2007), en la detección del mismo transgen en alfalfa.

En este trabajo pudimos observar que las muestras de ARN de las plantas sene 4, sene 10 y sene 12 amplificaron una banda de 583 pb (Figura 30), en correspondencia con el tamaño esperado, demostrándose así la expresión del transgen *ipt*. También se observó que las plantas sene 5, sene 9 y sene 11 (PCR negativas) no amplificaron bandas, confirmando que son escapes (Figura 30).

Una vez detectada la actividad transcripcional, se procedió para establecer los patrones de inserción del transgen *ipt* en las plantas RT-PCR positivas, a través de la técnica de *Southern blot*.

En este trabajo se utilizó la enzima *HindIII*, la cual se eligió por la particularidad de tener un sitio único de corte dentro del vector de transformación, para así visualizar el número de copias del transgen, lo cual nos indica el patrón de inserción de cada evento. Como resultado de la hibridación molecular se observó que la planta proveniente de embriones somáticos transformados (sene 12), presenta un mayor número de copias (8 copias) (Figura 34), observándose resultados similares a los

reportados por Garay (2003), en cuanto a la presencia de un mayor número de copias de ADN-T, en aquellas plantas transgénicas de alfalfa obtenidas a partir de embriones somáticos. También se observó que las plantas provenientes de pecíolos transformados (sene 4 y sene 10) presentan entre 2 a 6 copias (Figura 34), es decir que no se logró obtener una planta que presente copia única. Teniendo en cuenta que en algunos casos puede haber una correlación positiva entre el número de copias y el nivel de expresión, este aspecto podría contribuir para explicar las diferencias observadas como producto de la sobreexpresión del gen *ipt*.

Lin (2000) observó que de 5 líneas transgénicas de trébol blanco obtenidas con la misma construcción (AtMYB32-*ipt*), 3 presentaron copia única de inserción y el resto copias múltiples, y que no se observa una variación fenotípica en función al número de copias *ipt* presentes. Calderini *et al.* (2007), observaron que la mayoría de las plantas de alfalfa (SAG12-*ipt*) evaluadas presentaban copia única, no indicando diferencias en la expresión de los distintos eventos transgénicos.

Al observar los patrones de expresión de las plantas obtenidas con las construcciones AtMYB-*gus* y 35S-*gus*, se evidenció la diferencia de expresión que se presenta al trabajar con un promotor constitutivo, al observar que todos los tejidos de las plantas transformadas presentaban una coloración azul (Figura 35). Estos experimentos mostraron que las construcciones utilizadas son funcionales y que la construcción AtMYB32-*gus* se expresa principalmente en tejidos vasculares (Figura 36) en concordancia con lo reportado en trébol blanco por el grupo del Dr. Spangenberg. También se demostró que con el promotor 35S las plantas no presentan las alteraciones morfológicas detectadas en plantas AtMYB-*gus*.

Samac *et al.* (2004), compararon promotores constitutivos para establecer la expresión del transgen *gus* en alfalfa, con lo cual pudieron detectar una mayor actividad con el promotor CsVMV (Virus del mosaico de Cassava). Todas las células analizadas por tinción *in situ* tenían altos niveles de actividad enzimática y en general todos los promotores se expresaban. Cabe señalar que si bien el promotor CsVMV presentó máxima expresión *gus* en todos los órganos examinados respecto del promotor 35S, no fueron observadas diferencias fenotípicas en las plantas.

Aunque el promotor constitutivo 35S ha presentado una fuerte actividad enzimática en algunas especies de plantas, Samac *et al.* (2004) encontraron que este promotor no fue muy expresado en todas las células de alfalfa, observándose su expresión en hojas, raíces y en menor medida brotes y no se expresó en las células de la médula de los brotes, células corticales de la raíz, ni en los nódulos de la zona de simbiosis.

Por otra parte, en los fenotipos anormales observados *in vitro* de las plantas transgénicas provenientes de transformaciones con la construcción AtMYB32-*gus*, hay expresión *gus* en raíz pero no en la parte aérea, con lo cual se puede concluir que la expresión del promotor en raíz parece afectar el desarrollo normal vegetativo.

También se observó una variabilidad en los patrones de expresión de esta construcción, teniendo en cuenta que en pecíolos y folíolos provenientes de la misma planta se podía observar expresión *gus* y en otros no, aún en muestras con el mismo estado ontogénico. Sin embargo a través de la repetición de muestreos para tinción de raíces, siempre se observó expresión en los haces vasculares, mientras que en las muestras de la parte aérea fue variable.

El síntoma inicial y distintivo de la senescencia foliar es la degradación de los cloroplastos, como consecuencia de ello se observa un amarillamiento del tejido senescente.

Para evaluar la senescencia, inicialmente se logró ajustar un protocolo de desinfección y acondicionamiento de las muestras. Estableciéndose para la desinfección del material a evaluar una inmersión en 0,3% de cloro activo por 10 minutos y como medio de soporte agar agua al 0,6% (p/v). Posteriormente, se estableció un período de evaluación de 35 días con un fotoperíodo de 16 hs luz, considerando los resultados preliminares de los experimentos de senescencia con los clones C2-3, C2-4 y 19/17, en los cuales se observó que en general a los 35 días la totalidad de las muestras presentaban hojas con sectores amarillentos (síntomas iniciales de senescencia).

A su vez, con los mismos experimentos se observó un comportamiento diferencial en cuanto al inicio de la senescencia de los mismos clones, identificándose el clon 19/17 por presentar más tempranamente síntomas de senescencia foliar (Figura 39). Como consecuencia de dicho comportamiento, cuando se desea evaluar el material transgénico es necesario incluir en el ensayo los controles específicos, es decir aquellos que originalmente fueron los dadores del explante a transformar.

En las evaluaciones realizadas de senescencia de las plantas transgénicas que contenían el gen *AtMYB32-ipt*, se obtuvieron datos preliminares de los 6 eventos independientes obtenidos, observándose en tres de ellos (sene 4, sene 10 y sene 12) una tendencia de senescencia foliar retrasada con respecto al material no transgénico.

Resultados similares en cuanto a la tendencia del retraso de la senescencia foliar fue observada en alfalfa por Calderini *et al.* (2007) utilizando el promotor *SAG12-ipt* y MS como medio soporte para las hojas evaluadas y en trébol blanco por Lin (2000) con el promotor *AtMYB32-ipt* y papel de filtro estéril, embebido con agua destilada estéril como soporte.

Para confirmar dicho retraso se procedió a evaluarlo en función a la degradación de la clorofila, disminución de la concentración de las proteínas solubles foliares totales y a través del análisis de cambios en el perfil de las proteínas foliares.

Al considerar el contenido de clorofila *a* y *b*, pudimos observar una vez ajustada la composición de las muestras a evaluar (6ª y 7ª hoja), que al inicio de los experimentos (día 0) no hubo diferencia significativa entre los tratamientos (plantas con el transgen *ipt* incorporado y plantas sin el transgen *ipt* incorporado) y que a los 35 días el contenido de clorofila *a* y *b* fueron significativamente diferentes (Tabla 27). Por lo tanto las plantas que incorporaron el transgen *ipt* (sene 4, sene 10 y sene 12) presentaron un mayor contenido de clorofila con respecto a sus controles es decir plantas que no incorporaron el transgen (sene 5, sene 9 y sene 11) (Figuras 43 y 44).

Calderini *et al.* (2007) demostraron en un examen preliminar el efecto de la expresión del transgen *ipt* en hojas separadas de plantas transgénicas *SAG12-ipt* de alfalfa, ya que éstas permanecían verdes durante un período de 30 días comparando con los controles; estas observaciones fenotípicas *in vitro* fueron similares a las del análisis *in vivo*. Sin embargo, Calderini *et al.* (2007) al analizar la senescencia de las hojas *in vitro* observaron que a los 7 días ya se ha iniciado el proceso de senescencia (amarillamiento de las hojas), sin embargo en este trabajo se observó que recién a los 14 días hay indicios de tejidos cloróticos y que las plantas transgénicas obtenidas presentaban diferencias significativas a los 35 días de iniciado el experimento. Uno de los motivos de esta diferencia puede deberse al clon utilizado en cada trabajo;

considerando los resultados observados en los experimentos preliminares donde el clon 19/17 es el primero en presentar síntomas de senescencia, seguido por el clon C2-4 y por último el C2-3.

Lin *et al.* (2005) comunicaron en hojas cortadas de trébol blanco transformado con la misma construcción (AtMYB32 *ipt*), un marcado retraso de la senescencia y un desarrollo normal de las plantas, dicho retraso fue revelado por un incremento del contenido de clorofila, como así también en el incremento de número de hojas, largo de estolones y aumento del área foliar, aunque no mostraron que las diferencias fueron significativas. También observaron que a los 20 días posteriores a la escisión de las hojas no había síntomas visibles de senescencia.

Aunque la pérdida de clorofila es cualitativamente importante, al privar al tejido de su capacidad fotosintética, hay otros procesos metabólicos que son cuantitativamente significativos en la senescencia foliar. Entre éstos, la degradación de proteínas es el proceso más importante, ya que permite el transporte de aminoácidos liberados a otras partes de la planta. Existen numerosas proteasas que se han identificado de forma específica en tejido foliar senescente y que participan en la proteólisis que tiene lugar durante la senescencia de los tejidos. Por lo cual se considera importante establecer los niveles de proteínas, para poder cuantificar la senescencia.

En este trabajo se determinó el contenido de proteínas totales foliares de las diferentes plantas a evaluar y se pudo observar que el contenido de las mismas al inicio del experimento (día 0) no presentó diferencias significativas entre los tratamientos (plantas que incorporaron el transgen *ipt* y plantas que no incorporaron el transgen), partiendo así con contenidos similares de proteínas en todas las muestras a evaluar.

Si tomamos en cuenta el contenido de proteínas a los 35 días, observamos una diferencia significativa entre tratamientos y con el test de comparación de medias encontramos que los contenidos de proteínas son mayores en aquellas plantas que incorporaron el transgen *ipt* (sene 10, sene 4 y sene 12), los cuales no se diferencian del contenido de la planta sene 11 que no incorporó dicho transgen y que todas éstas se diferencian de la planta sene 9, la cual presenta un contenido bajo de proteínas (Tabla 28).

Dichos resultados nos demuestran que las plantas que incorporaron el transgen *ipt* presentan un mayor contenido de proteínas que aquellas plantas que no lo incorporaron, resultados similares fueron obtenidos en plantas de tabaco transformadas con el mismo gen (*ipt*), pero bajo el promotor SAG12 (Jordi *et al.* 2000).

Al tomar en cuenta la intensidad de la banda de la subunidad mayor de la Rubisco, se observó que las intensidades de la misma al inicio (día 0) del experimento son similares tanto en las plantas que incorporaron el transgen, como en aquellas que no lo incorporaron. Sin embargo, al finalizar el ensayo (día 35) se observó que las plantas sene 5, sene 9 y sene 11 (plantas que no incorporaron el transgen) presentaban en general una mayor disminución de la intensidad de la banda y que las plantas sene 4, sene 10 y sene 12 que incorporaron el transgen *ipt* presentaban mayores intensidades (Figuras 51 y 52).

En la planta sene 9 a los 35 días no se observan bandas, lo cual no significa la degradación total de las proteínas, sino que la ausencia de bandas se justifica sobre la base de la capacidad de detección del sistema analítico utilizado (Figura 54).

Si comparamos las plantas que incorporaron el transgen entre sí, también se observan diferencias en la intensidad de la banda al finalizar el ensayo, destacándose entre estas la planta sene 4 por su mayor intensidad.

Estos resultados son coherentes si tomamos en cuenta que las citoquininas inducen la expresión de genes fotosintéticos, promueven la síntesis de proteínas y mantienen altos niveles de Rubisco durante la senescencia foliar (Ookawa *et al.* 2004).

Resultados similares fueron observados por Jordi *et al.* (2000) en hojas senescentes de plantas transgénicas de tabaco (SAG12-*ipt*) y por González-Santos y sus colaboradores (2009) en hojas de trigo asperjadas con una solución de la citoquinina BAP.

Conclusiones finales

Se obtuvieron plantas transgénicas de alfalfa con fenotipo normal, las cuales contenían los transgenes AtMYB32-*ipt* y AtMYB32-*gusA*.

De las transformaciones realizadas con el vector binario AtMYB32-*ipt*, solamente se lograron establecer en cámara de cría 6 plantas (eventos independientes). Si bien, se observó alta eficiencia de transformación, (superior al 50%) las plantas transgénicas no soportaron la etapa de rustificación. Este resultado, contrasta con los habitualmente obtenidos por el grupo de trabajo con otras construcciones bajo control de promotores constitutivos. Probablemente, el estrés durante el cultivo *in vitro* haya inducido la expresión de citoquininas y estimulado la regeneración.

Se logró establecer en alfalfa el patrón espacio-temporal de expresión de los promotores AtMYB32 de *A. thaliana* y 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV), a través de ensayos de tinción histoquímica sobre órganos de las plantas transgénicas de alfalfa que contenían el transgen *gusA*.

En plantas de fenotipo normal la expresión del transgen AtMYB32-*gusA*, se limitó a los tejidos vasculares, mientras que en las de fenotipo anormal solo se observó expresión *gus* en raíz, lo cual indicaría que existen diferencias en la expresión del promotor y que cuando se expresa en raíz parece afectar el desarrollo normal vegetativo, especialmente la dominancia apical cuando este promotor controla al gen *ipt*.

En la parte aérea de plantas transgénicas que presentaron fenotipo normal, se detectó amplia variabilidad en los patrones de expresión *gus* tanto en pecíolos como en folíolos provenientes de la misma planta y con el mismo estado ontogénico, indicando que el promotor AtMYB32 se induce de manera aleatoria.

Los resultados moleculares confirmaron la presencia y expresión del transgen en las plantas obtenidas y el análisis por PCR que se efectuó permitió poner en evidencia la integridad de los transgenes *ipt* y *gusA*.

Por la técnica de *Southern blot* se establecieron los patrones de inserción del transgen *ipt* observándose inserciones múltiples en todas las plantas transgénicas que lo incorporaron, resultando atípico con el sistema de transformación utilizado.

Análisis preliminares de senescencia foliar sobre hojas cortadas de las plantas transgénicas que contenían el transgen AtMYB32-*ipt*, en algunos de los experimentos, tendieron a mostrar senescencia foliar retrasada con respecto al material no transgénico en coincidencia con la expresión aleatoria del gen *gus* bajo control del promotor AtMYB32.

Teniendo en cuenta que la degradación de clorofila y proteínas totales foliares están asociadas a la senescencia, las mismas se analizaron en 6ª y 7ª hoja. Al finalizar los experimentos (día 35) las diferencias entre las plantas con el transgen *ipt* incorporado, que presentaron un mayor contenido de clorofila *a* y *b*, y plantas sin el transgen *ipt* incorporado fue significativa, presentando también las primeras un mayor contenido de proteínas.

En igual sentido, al tomar en cuenta la intensidad de la banda de la subunidad mayor de la Rubisco, se observó que la intensidad de la misma al finalizar los experimentos son mayores en las plantas que incorporaron el transgen *ipt*. Si comparamos entre sí las plantas que incorporaron el transgen, también observamos diferencias en la intensidad de la banda al finalizar el ensayo, destacándose entre estas

la planta sene 4 por su mayor intensidad, la cual también mostró un comportamiento diferencial en los distintos bioensayos realizados con folíolos cortados.

Considerando los resultados obtenidos, concluyo que estos son relevantes, si tenemos en cuenta que la alfalfa es consumida por los animales en algunos casos en forma de rollos o fardos y que una vez cortada, los niveles de proteínas totales en hojas van disminuyendo, no así en aquellas plantas que incorporaron el transgen *ipt*. Por lo tanto considero promisorio continuar trabajando con estas líneas transgénicas en lo que se refiere a otros parámetros de calidad como digestibilidad de la materia seca (DMS), proteína bruta (PB), etc.

Bibliografía

Ardila, F.; Gómez, M.C.; Diéguez, M.J.; Pagano, E.; Turica, M.; Lecuona, R.; Arolfo, V.; Basigalup, D.; Vazquez Rovere, C.; Hopp, E.; Franzone, P. and Rios R. 2005. Obtainment of alfalfa (*Medicago sativa* L.) transgenic plants expressing a *Bacillus thuringiensis* endotoxin and their evaluation against alfalfa caterpillar (*Colias lesbia*). 4th Molecular breeding for the genetic improvement of forage crops and turf, Aberystwyth, Wales, U.K. 3-7 de julio de 2005.

Arnon DI. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts - polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology. 24:1-15.

Azcón Bieto y Talón. 2000. Fundamentos de Fisiología Vegetal.

Bagga, S.; Sutton, D.; Kemp, J.D. and Sengupta-Gopalan, Ch. 1992. Constitutive expression of the β -phaseolin gene in different tissues of transgenic alfalfa does not ensure phaseolin accumulation in non-seed tissue. Plant Mol. Biol. 19:951-958.

Baldock, J.O.; Higgs, R.L.; Paulson, W.H.; Jakobs, J.A. and Schrader, W.D. 1981. Legume and mineral fertilizer effects on crop yields of several crop sequences in the Upper Mississippi Valley. Agronomy Journal. 73: 885-90.

Bevan, M.; Flavel, R. and Chilton, M. 1983. A chimaeric antibiotic resistance marker gene as a selectable marker for plant cell transformation. Nature. 304, 184-187.

Bolton, J.L. 1962. Alfalfa, pp. 488. London: Leonard Hill. (Books) Ltd and New York: Intersc. Public Inc. 84.

Byres, M. 1971. The aminoacid composition of some leaf protein preparation, Leaf Protein, p95. Pirie, N. W. ed. Blackwell Scientific Publications Oxford and Edinburgh.

Calderini, O.; Bovone, T.; Scotti, C.; Pupillo, F.; Piano, E. and Arcioni, S. 2007. Delay of leaf senescence in *Medicago sativa* transformed with the ipt gene controlled by the senescence-specific promoter SAG12. Plant Cell Rep. 26:611-615.

Carrer, H.; Hockenberry, T.; Svab, Z. and Maliga, P. 1993. Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. Molecular & General Genetics. 241:49-56.

Casler, M. and Kaeppler, H. 2001. Molecular breeding for herbage quality in forage crops. En Proceedings of the 2nd International Symposium Molecular Breeding of Forage Crops. 19 al 24 de noviembre del 2001. Lorne y Hamilton, Australia. 175-188.

Casler, M. and Vogel, K. 1999. Accomplishments and impact from breeding for increased forage nutritional value. Crop Sci. 39: 12-20.

Ceppi, D.; M. Sala; E. Gentinetta; A. Verderio y M. Motto. 1987. Genotype dependent leaf senescence in maize. Plant Physiol. 85:720-725.

Chabaud, M.; Passiatore, J.E.; Cannon, F. and Buchanan-Wollaston, V. 1988. Parameters affecting the frequency of Kanamycin resistant alfalfa obtained by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. Plant Cell Reports. 7:512-516.

Chen, C.M. and Petschow, B. 1978. Cytokinin biosynthesis in cultured, rootless tobacco plants. Plant Physiology. 62:861-865.

Chen, L.F.O.; Hwang, J.Y.; Charng, Y.Y.; Sun, C.W. and Yang, S.F. 2001. Transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. italica) with isopentenyltransferase

gene via *Agrobacterium tumefaciens* for postharvest yellowing retardation. *Mol. Breed.* 7:243-257.

Chiesa, I.; V. Salomón; M. Insani; E. Pagano; R. Rios; P. Franzone and F. Ardila. 2007. Intervening the flavonoid biosynthetic pathway in Alfalfa. 5th International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf, Sapporo, Hokkaido, Japón, 1 al 6 Julio de 2007.

CIMMYT 2005. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Third Edition. Mexico, D.F.: CIMMYT.

Collino, D.; Dardanelli, J. y De Luca, M. 2007. Uso del agua y la radiación para producción de forraje Cap. 3 en El cultivo de la alfalfa en la Argentina. Editor Dasigalup, D.H., Ediciones INTA.

Cowan, A.K.; Freeman, M.; Bjorkman, P.O.; Nicander, B.; Sitbon, F. and Tillberg, E. 2005. Effects of senescence-induced alteration in cytokinin metabolism on source-sink relationships and ontogenic and stress-induced transitions in tobacco. *Plant.* 2005. 221:801-814.

Crafts-Brandner, S.J.; F.E. Below; V.A. Wittenbach; J.E. Harper; R.H. Hageman. 1984. Differential senescence of maize hybrids following ear removal. II. Selected leaf. *Plant Physiol.* 74:368-373.

Crozier, A.; Kamiya, Y.; Bishop, G. and Yokota, T. 2000. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. p 850-929. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* Eds. Buchanan B., Gruissem W., Jones R. American Society of Plant Biologists.

Davies B.D. 1988. The lethal action of aminoglycosides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 22:1-3.

De Block, M.; Botterman, J.; Vandewiele, M.; Dockx, J.; Thoen, C.; Gossele, V.; Rao Movva, N.; Thompson, C.; van Montagu, M. and Leemans, J. 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO* 6:2513-2518.

De Block, M.; Herrera-Estrella, L.; Van Montagu, M.; Schell, J. and Zambryski, P. 1984. Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. *EMBO J.* 3(8): 1681-1689.

Desgagnés, R.; Laberge, S.; Allard, G.; Khoudi, H.; Castonguay, Y.; Lapointe, J.; Michaud, R. and Vézina, L.P. 1995. Genetic transformation of commercial breeding lines of alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant Cell. Tissue and Organ Culture.* 42:129-140.

D'Halluin, K.; Botterman, J. and De Greef, W. 1990. Engineering of Herbicide-resistant Alfalfa and Evaluation under Field Conditions. *Crop Sci.* 30:866-871.

De Lucca, G.M. y V.S. Trippi. 1982a. Regulación de clorofilas y proteínas solubles por cinetina y cicloheximida, en condiciones de luz y oscuridad durante la senescencia foliar en *Phaseolus vulgaris* L. *Pitón.* 42:73-82.

De Lucca, G.M. y V.S. Trippi. 1982b. Cambios en la actividad proteasa y rebonucleasa durante la senescencia foliar de *Phaseolus vulgaris* L. y su regulación por cinetina y cicloheximida en luz y oscuridad. *Pitón.* 42:83-92.

Díaz, M.L.; Zappacosta, D.C.; Franzone, P.M.; Rios, R.D. 2004. Transformación Genética *Parte III.-Cap. 3* en Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Eds. Echenique, V.; Rubinstein, C.; Moroginski, L. Ediciones INTA.

- Doods, J.H. and Roberts, L.W. 1995.** Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press.
- Drivdahl, R.A. and K.V. Thimann. 1977.** Proteases of senescing oat leaves I. Purification and general properties. *Plant Physiol.* 59:1059-1063.
- Dus Santos, M.; Carrillo, C.; Ardila, F.; Rios, R.D.; Franzone, P.; Piccone, M.E.; Wigdorovitz, A. and Borca, M. 2005.** Development of transgenic alfalfa plants containing the foot and mouth disease virus structural polyprotein P1 and its utilization as an experimental immunogen. *Vaccine.* 23 (15) 1838-1843.
- Du, S.; Erickson, L. and Bowley, S. 1994.** Effect of plant genotype on the transformation of cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports.* 13:330-334.
- Engler-Blum, G.; Meier, M.; Frank, J. and Müller G.A. 1993.** Reduction of Background Problems in Nonradioactive Northern and Southern blot Analyses Enables Higher sensitivity than ³²P-Bared Hybridizations. *Analytical Biochemistry.* 210:235-244.
- Faiss, M.; Zalubilova, J.; Strnad, M. and Schmulling, T. 1997.** Conditional transgenic expression of the *ipt* gene indicates a function of cytokinins in paracrine signaling in whole *tobacco* plants. *The Plant Journal.* 12: 401-415.
- Ferri, A.; Galleta, G.; Rios, R.; Llorente, B.; Barreto, D.; Comerio, R.; Ardila, F. and Franzone, P. 2007.** Obtainment and characterization of alfalfa (*Medicago sativa* L.) transgenic plants with fungal disease tolerance. 5th International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf, Sapporo, Hokkaido, Japón, 1 al 6 Julio de 2007.
- Ferri, A.; García A.; Ardila, F.; Rios, R. D.; Llorente, B. y Franzone, P. 2005.** Evaluación de las actividades glucanasa y quitinasa en plantas transgénicas de alfalfa. JORNACITI 2005, UNLu Luján. 1-3 de noviembre de 2005.
- Futterer, J.; Gisel, A.; Iglesias, V.; Kloti, A.; Kost, B.; Mittelsten Scheid, O.; Neuhaus, G.; Neuhaus-Url, G.; Scrott, M.; Shillito, R.; Spangenberg, G. and Wang, Z. 1995.** Standard molecular techniques for the analysis of transgenic plants. p215-263. En *Gene transfer to plants*, Eds. I. Potrykus and G. Spangenberg. Springer Verlag.
- Garay, R. 2003.** Patrones de inserción de transgenes en plantas de alfalfa obtenidas vía *Agrobacterium tumefaciens* o por biolística. *Journal of Basic and Applied Genetics.* 15:114.
- Gan, S. and Amasino, R. 1995.** Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science.* 270: 1986-1988.
- Gepstein, S.; Sabehi, G.; Carp, M.J.; Hajouj, T.; Nesher, O.; Yariv, I.; Dor, C. and Bassani, M. 2003.** Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *Plant J.* 36:629-642.
- Gepstein, Shimon. 2004.** Leaf senescence—not just a wear and tear phenomenon. *Genome Biol.* 5:212. <http://genomebiology.com/2004/5/3/212>
- Gonzalez-Santos, R.; Delgado-Alvarado, A.; Zavaleta-Mancera, H.A. y Herrera-Cabrera, B.E. 2009.** La citocinina BAP promueve la acumulación de hexosas e incrementa la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxicinas durante el retraso de la senescencia foliar de trigo. *Agrociencia* [en línea].

43:379-391. Disponible en: ISSN1405-3195.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952009000400005&lng=pt&nrm=iso

Goodner, B.; Hinkle, G.; Gattung, S.; Miller, N.; Blanchard, M.; Quorollo, B.; Goldman, B. S.; Cao, Y.; Askenazi, M.; Halling, C.; Mullin, L.; Houmiel, K.; Gordon, J.; Vaudin, M.; Iartchouk, O.; Epp, A.; Liu, F.; Wollam, C.; Allinger, M.; Doughty, D.; Scott, C.; Lappas, C.; Markelz, B.; Flanagan, C.; Crowell, C.; Gurson, J.; Lomo, C.; Sear, C.; Strub, G.; Cielo, C. and Slater, S. 2001. Genome Sequence of the Plant Pathogen and Biotechnology Agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*. 294:2323-2328.

Groot, S.P.C.; Bouwer, R.; Busscher, M.; Lindhout, P. and Dons, H.J. 1995. Increase in endogenous zeatin riboside by introduction of the *ipt* gene in wild type and the lateral suppressor mutant of *tomato*. *Plant Growth Regul.* 16:27–36.

Guamet, J.J. 2003. La senescencia foliar: incógnitas del desmantelamiento celular [en línea]. Disponible en: <http://www.safv.com.ar/Giamet101004.pdf>

He, Y.; Tang, W.; Swain, J.D.; Green, A.L.; Jack, T.P. and Gan, S. 2001. Networking senescence-regulating pathways by using *Arabidopsis* enhancer trap lines. *Plant Physiol.* 126:707-716.

Hedden, P. and Phillips, A. 2000. Manipulation of hormone biosynthetic genes in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology.* 11: 130-137.

Hendry, G.W. 1923. Alfalfa in history. *J. A. Soc. Agron.* 15:171-176.

Herrera-Estrella, L.; Depicker, A.; van Montagu, M. and Schell, J. 1983 Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature*. 303:209-213.

Hijano, E. y Navarro, A. 1995. La alfalfa en la Argentina. *Enciclopedia de Agro. de Cuyo*. p281.

Hill, K.K.; Jarvis-Eagan, N.; Halk, E.L.; Krahn, K.J.; Liao, L.W.; Mathewson, R.S. 1991. The development of virus-resistant alfalfa, *Medicago sativa* L. *Bio/Technology*. 9:373-377.

Hoekema, A.; Hirsch, P.; Hooykaas, P. and Schilperoort, R. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*. 303:179-180.

Hooykaas, P. 1988. *Agrobacterium* molecular genetics. *Plant Molecular Biology Manual* A4:1-13. Eds. S. Gelvin, R. Schilperoort, D. Verma. Kluwer Academic Publishers.

Horsch, R.B.; Fraley, R.T.; Rogers, S.G.; Sanders, P.R.; Lloyd, A. and Hoffmann, N. 1984. Inheritance of Functional Foreign Genes in Plants. *Science*. Vol. 223. n° 4635:496-498.

INDEC 2002. Datos del sector agropecuario, agricultura, forrajeras [en línea]. Disponible en: <http://www.indec.gov.ar>.

Ishida, H.; Anzawa, D.; Kokubun, N.; Makino, A. and Mae, T. 2002. Direct evidence for non-enzymatic fragmentation of chloroplastic glutamine synthetase by a reactive oxygen species. *Plant Cell Environ.* 25: 625–631.

- Ishida, H.; Makino, A. and Mae, T. 1999.** Fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species occurs near Gly-329. *J. Biol. Chem.* 274:5222–5226.
- Insani, E.M.; M.R. Garay; V. Salomón; E. Pagano; N. Pensel; F. Ardila; P. Franzone y R.D. Rios. 2005.** Modificación del metabolismo de flavonoides en plantas transgénicas de alfalfa (*Medicago sativa* L.). 34° Congreso Argentino de Genética, Trelew, Chubut, Argentina. 11-14/9/2005.
- Itria, C. 1986.** Investigación, tecnología y producción de alfalfa. Biblioteca Científica del INTA. 7-24.
- Itria, C.D. y Bariggi, C. 1980.** Producción de semilla de alfalfa en Argentina. En: Simposio de Producción de Semilla de Alfalfa. IDIA. Argentina nº 391-392:1-4.
- Jefferson, R.A.; Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. 1987.** GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal*. 6: 3901–3907.
- Jordi, W.; Schapendonk, A.; Davelaar, E.; Stoopen, G.M.; Pot, C.S.; De Visser, R.; Van Rhijn, J.A.; Gan, S. and Amasino, R.M. 2000.** Increased cytokinin levels in transgenic PSAG12-IPT *tobacco* plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. *Plant, Cell and Environment*. 23, 279-289.
- Kende, H. 1971.** The cytokinins. *International Review of Cytology*, 31: 301 338.
- King, C.M. and Kriek, E. 1975.** The differential reactivity of the oxidations products of o-Aminophenols towards protein and nucleic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, 111:147.
- Kinoshita, K.; Yamada, K.; Hiraiwa, N.; Kondo, M.; Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. 1999.** Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *Plant Journal*. 19:43-53.
- Laemmli, U. and K. Cleavage. 1970.** Of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lazo, G.; Stein, P. and Ludwig, R. 1991.** A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biol/Technology*. Vol 9: 963-967.
- Leonardón, S.; Pérez Fernández, J. y Basigalup, D. 2010.** Descubren una nueva enfermedad en alfalfa. INTA informa [en línea]. Fecha de consulta: 05 de Octubre de 2010. Disponible en: <http://intainforma.inta.gov.ar/?p=2693>.
- Leemans, J.; Shaw, C.; Deblaere, R.; De Greve, H.; Hernalsteens, J.P.; Maes, M.; Van Montagu, M. and Schell, J. 1981.** Site-specific mutagenesis of *Agrobacterium* Ti plasmids and transfer of genes to plant cells. *J Mol Appl Genet*. 1 (2):149-164.
- Lesins, K. 1955.** Techniques for rooting cuttings, chromosome doubling and flower emasculation in alfalfa *Canadian Journal of Agricultural Science*. 35:58-67.
- Letham, D.S. 1994.** Cytokinins as phytohormones – Sites of biosynthesis, translocation, and function of translocated cytokinin. In *Cytokinins, Chemistry, Activity and Function*, D.W.S. Mok and M.C. Mok, eds (Boca Raton, Fl:CRC Presss), p57-80.
- Li, S.; Heazlewood, J. and Parish, R. 1999.** Cloning of three *myb*-like genes from *Arabidopsis thaliana* (accession nos. U26933, AF048841 and U26934). *Plant Physiology*. 121: 313.

- Li, S. and Parrish, R. 1995.** Isolation of two novel *myb*-like genes from *Arabidopsis* and studies on the DNA-binding properties of their products. *The Plant Journal*. 8: 963-972.
- Li, Y.; Hagen, G. and Guilfoyle, T.J. 1992.** Altered morphology in transgenic tobacco plants that over-produce cytokinins in specific tissues and organs. *Developmental Biology*. 153:386-395.
- Lichtenthaler, H.K. 1987.** Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol*. 148:350-382.
- Lin, Y.H.; Ludlow, E.; Kalla, R.; Pallaghy, C.; Emmerling, M. and Spangenberg, G. 2003.** Organ-specific developmentally-regulated and abiotic stress-induced activities of four *Arabidopsis thaliana* promoters in transgenic white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Science*. 165: 1437-1444.
- Lin, Y. H. 2000.** Studies on cytokinin action in stressed tomato plants and transgenic white clover plants. PhD Thesis School of Botany, La Trobe University, Bundoora, Victoria, Australia.
- Ludlow, E.; Lin, Y. H.; Chalmers, J.; Kalla, R.; Pallaghy, C. and Spangenberg, G. 2000.** Development of transgenic white clover with delayed leaf senescence. Conference Molecular Breeding of Forage Crops 2000. 19 - 24 november 2000. Lorne y Hamilton, Australia.p. 84.
- Mancilla, C.G.E.; Casterón, C.R.; Rosas, T.M; Blanco, E.Z. y Pérez, S.L.J. 2002.** Extracción y Separación de Pigmentos Vegetales. Pigmentos fotosintéticos [en línea]. Disponible en: <http://www.scribd.com/doc/16675209/6-EXTRACCION-Y-SEPARACION-DE-PIGMENTOS-VEGETALES>
- Ma, Q.H. and Liu, Y.Ch. 2009.** Expression of isopentenyl transferase gene (*ipt*) in leaf and stem delayed leaf senescence without affecting root growth. *Plant Cell Report*. 28:1759-1765.
- Martineau, B.; Houck, C.M.; Sheehy, R.E. and Hiatt, W.R. 1994.** Fruit-specific expression of the *Agrobacterium tumefaciens* isopentenyl transferase gene *tomato*: effects on fruit ripening and defence-related gene expression in leaves. *The Plant Journal*. 5:11-19.
- Martin, C. and Paz-Ares, J. 1997.** MYB transcription factors in plants. *Trends in Genetics*. 13: 67-73.
- Matthew, S.; McCabe, M.S.; Garratt, L.C.; Scepers, F.; Jordi, W.J.; Stoopen, G.M.; Davelaar, E.; van Rhijn, J.H.; Power, J.B. and Davey, M.R. 2001.** Effects of P_{SAG12}-IPT Gene Expression on Development and Senescence in Transgenic Lettuce. *Plant Physiology*. 127:505-516.
- McCaben, D.E.; Swain,W.F.; Martinell, B.J.; and Christou, P. 1988.** Stable transformation of soybean (*Glicine max*) by particle acceleration. *Biotechnology*. 6:923-926.
- McCabe, M.S.; Garratt, L.C.; Scepers, F.; Jordi, W.J.; Stoopen, G.M.; Davelaar, Evan.; Rhijn, J.H.; Power, J.B. and Davey, M.R. 2001.** Effects of P (SAG12)-IPT gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. *Plant Physiol* 127(2):505-516.

- McKersie, B.; Chen, Y.; de Beus, M. and Bowley, S. 1993.** Superoxide Dismutase Enhances Tolerance of Freezing Stress in Transgenic Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 103:1155-1163.
- McKenzie, M.; Mett, V.; Reynolds, P. and Jameson, P. 1998.** Controlled cytokinin production in transgenic *tobacco* using a copper-inducible promoter. *Plant Physiol.* 116: 969-977.
- Medford, J.; Horgan, R.; El-Sawi and Klee, H. 1989.** Alterations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene. *The Plant Cell.* 1: 403-413.
- Michaud, R.; Lehman, W.F. and M.D. Rumbaugh, 1988.** World distribution and historical development. In: Hanson, A. A. (Ed) *Alfalfa and alfalfa improvement* Madison, Wisconsin Agronomy monograph. 29:25-91.
- Miller, C.O.; Skoog, F.; Okomura, F.S.; Saltza, M.H., von Strong, F.M. 1956.** Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *Journal of the American Chemistry Society.* 78:1345-1350.
- Moltrasio, R.; Robredo, C.; Gómez, C.; Díaz Paleo, A; Díaz, D; Rios, R.D. and Franzone, P.M. 2004.** Alfalfa (*Medicago sativa*) somatic embryogenesis: genetic control and introduction of favourable alleles into elite Argentinean germplasm. *Plant Cell, Tissue and Culture.* 77: 119-124.
- Mozgovoij, M.; Bellido, D.; Gonzalez, D.; Parreño, V.; Gomez, C.; Ardila, F.; Dus Santos, M.J. and Wigdorovitz, A. 2007.** Production of VP8 protein of bovine rotavirus C486 P(1)G6 in transgenic alfalfa.. VI Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria. Viña del Mar, Chile, 22 al 26 de Octubre de 2007.
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G. and Erlich, H. 1986.** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* 51:263–273.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol.Plant.*15:473-479.
- Nahirñak, V. 2008.** Transformación genética de alfalfa. Tesis Licenciatura en Genética Universidad de Misiones, Argentina.
- Ookawa, T.; Naruoka, Y.; Sayama, A. and Hirasawa, T. 2004.** Cytokinin effects on ribulose 1–5 biphosphate carboxylase/oxygenase and nitrogen partitioning in rice during ripening. *Crop Sci.* 44: 2107–2115.
- Ooms, G.; Ricito, R.; Kendall, A.; Keys, A.; Lawlor, D.; Smith, S.; Turner, J. and Young, A. 1991.** Phenotypic changes in T-cyt-transformed potato plants are consistent with enhanced sensitivity of specific cell types to normal regulation by root-derived cytokinin. *Plant Molecular Biology* 17:727-743.
- Porra, R.J.; Thompson, W. A. and Kriedemann, P.E. 1989:** Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectrometry. *Biochim Biophys Acta* 975:384-394.
- Racca, R.; Collino, D.; Dardanelli, J.; Basigalup, D.; González, N.; Brenzoni, E.; Hein, N. y Balzarini, M. 2001.** Contribución de la fijación biológica de nitrógeno a la

nutrición nitrogenada de la alfalfa en la región pampeana. Edit. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

Redig, P.; Scmulling, T. and Van Onckelen, H. 1996. Analysis of cytokinin metabolism in *ipt* transgenic tobacco by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Plant Physiol.* 112: 141-148.

Rios, R.D.; F. Ardila; E.M. Pagano; M.C. Gómez y P.M. Franzone. 2007. Biotecnología aplicada al Mejoramiento Genético de alfalfa. El Cultivo de la Alfalfa en la Argentina. Editor: Daniel Basigalup. Ediciones INTA. (ISBN: 978-987-521-242-8). Bs. As. 109-129.

Rios, R.D.; Moltrasio, R.; Gómez, C.; Robredo, C.; Díaz Paleo, A. y Díaz D. 1994. Control Genético de la Regeneración *in Vitro* en alfalfa. XXV Congreso Argentino de Genética. La Plata. p 15.

Ripodas, I. 2003. La alfalfa en la cuenca del salado Grupo Operativo Salado Sur, Unidad Operativa Cuenca del Salado. INTA.

Rivero, R.M.; M. Kojima; A. Gepstein; H. Sakakibara; R. Mittler; S. Gepstein and E. Blumwald. 2007. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 December 4; 104(49): 19631–19636.

Robatzek, S. and Somssich, I. 2002. Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes & Development* 16:1139-1149.

Robbins, W.J. 1922. Cultivation of excised root tips and stem tips under sterile conditions. *Bot. Gaz.* 73, 376–390.

Robredo, C.G.; Rios, R.D.; Franzone, P.M.; Díaz, D.G.; Moltrasio, R. y Procopiuk, A.M. 1993. Control Genético de la Regeneración *in Vitro*. II Simposio Argentino de Biotecnología Vegetal, Huerta Grande, Córdoba, Argentina.

Roche Molecular Biochemical DIG Application Manual for Filter Hybridization. 2000. Roche Diagnostics GmbH. Editorial Management.

Rodríguez, J. A.; M. W. de Holgado y Vicente, R.E.H. 1986. Evaluación de cultivares de alfalfa y panorama varietal en Argentina. En: Investigación, Tecnología y Producción de Alfalfa. 325-369.

Roeckel, P.; Rancia, T. and Brevet, J. 1997. Effects of seed-specific expression of a cytokinin biosynthetic gene on canola and tobacco phenotypes. *Transgenic Research* 6:133-141.

Romero, N. 2003. Alfalfa: Limitantes productivas en la Región Pampeana. En Sitio argentino de producción animal; Producción y manejo de pasturas; Pasturas cultivadas: Alfalfa. www.produccion-animal.com.ar

Rossanigo, R.O. 1992. Cómo elegir las alfalfas. Primer Congreso Nacional de Lechería. p 68-74.

Roulin, S. and Feller, U. 1998. Light-independent degradation of stromal proteins in intact chloroplasts isolated from *Pisum sativum* L. leaves: requirement for divalent cations. *Plant*, 205: 297–304.

Samac, D.A.; Dornbusch, M., Gebeyaw, M.T., Purev, S., Temple, S.J. 2004. A comparison of constitutive promoters for expression of transgenes in alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Research.* 13:349-361.

- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989.** Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandman, J.; Johnson, D.; Johnson, L. and Reich, J. 2003.** Maximizing growth and productivity of alfalfa through biotechnology. Central Alfalfa Improvement Conference. Julio 21-25, 2003.
- SAS Institute Inc. 2008.** SAS/STAT User`s Guide. Release 8.00 Edition Sitio: INTA 14759001.
- Sawada, H., Ieki, H. and Matsuda, I. 1995.** PCR Detection of Ti and Ri Plasmids from Phytopathogenic *Agrobacterium* Strains. Applied and Environmental Microbiology, 6 (2):828-831.
- Schenk, B. and Hildebrant, A. 1972.** Medium and techniques for induction and growth of monocotyledoneous and dicotyledoneous cell cultures. Can.J.Bot. 50:199-204.
- Schmülling T.; Beinsberger S.; De Greef J.; Schell J.; Van Onckelen H. and Spena A. 1989.** Construction of a heat- inducible chimaeric gene to increase the cytokinin content in transgenic plant tissue. FEBS Letters 249:401–406.
- Schrott, M. 1995.** Selectable marker and reporter genes in: I Potrykus & G Spangenberg (eds) gene transfer to plants. Springer-Verlag, Berlin, 325-336.
- Shahin, E.A.; Spielmann, A.; Sukhapinda, K.; Simpson, R. and Mayer, Y. 1986.** Transformation of Cultivated Alfalfa Using Disarmed *Agrobacterium tumefaciens*. Crop Sci.26: 1235-1239.
- Sharp, W.; Larsen, E.F.; Paddock, P.O. and Raghaven, V. 1982.** Plant Cell and Tissue Culture. Ohio State University Press.
- Shetty, K. and McKersie, B. 1993.** Proline, thioproline and potassium mediated stimulation of somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Plant Science. 88:185-193.
- Shikanai, T.; Shimizu, K.; Ueda, K.; Nishimura, Y.; Kuroiwaa, T. and Hashimoto, T. 2001.** The chloroplast clpP gene, encoding for a proteolytic subunit of ATP-dependent protease, is indispensable for chloroplast development in tobacco. Plant Cell Physiology. 42: 264–273.
- Singh, S.; Letham, D.S. and Palni, L.M.S. 1992.** Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. V. Endogenous cytokinin levels and metabolism of zeatin riboside in leaf disc from green and senescent tobacco (*Nicotiana rustica*) leaves. Journal of Plant Physiology 139:279-283.
- Skoog, F.; Armstrong, D.J. 1970.** Cytokinins. Annual Review Plant Physiology. 21: 359-384.
- Smart, C.M.; Scofield, S.R.; Bevan, M.W. and Dyer, T.A. 1991.** Delayed leaf senescence in *tobacco* plants transformed with *tmr*, a gene for cytokinin production in *Agrobacterium*. Plant Cell 3:647-656.
- Smigocki, A.; Neal, J.; McCanna, I. and Douglas, L. 1993.** Cytokinin-mediated insect resistance in *Nicotiana* plants transformed with *ipt* gene. Plant Mol. Biol. 23: 325-335.
- Smigocki A.C. 1991.** Cytokinin content and tissue distribution in plants transformed by a reconstructed isopentenyl transferase gene. Plant Molecular Biology 16:105-115.

- Smigocki, A. and Owens, L. 1988.** Cytokinin gene fused with a strong promoter enhances shoot organogenesis and zeatin levels in transformed plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5131-5135.
- Soto, G.C. 2004.** Obtención de plantas transgénicas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) resistentes a glufosinato de amonio mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Tesina de grado. UBA-FCEN- Departamento de Ciencias Biológicas.
- Sthamnn, M. A. 1963.** Plant proteins. *Annual. Review. Plant Physiol.* 14:137-158.
- Thomas, H.; Ougham, H.J. and Hörtensteiner, S. 2001.** Recent advances in the cell biology of chlorophyll catabolism. *Adv. Bot. Res.* 35:1-52.
- Thomas, H. and J.L. Stoddart. 1980.** Leaf Senescence. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31:83-111.
- Thomas, H. and J.L. Stoddart. 1977.** Biochemistry of leaf senescence in grasses. *Ann. Appl. Biol.* 85:461-463.
- Thomas, J.C.; Wasmann, C.C.; Ecth. C.; Dunn, R.L.; Bohnert, H.J. and McCoy, T.J. 1994.** Introduction and expression of an Insect proteinase inhibitor in Alfalfa (*Medicago sativa* L). *Plant Cell Reports.* 14: 31-36.
- Thomas, J.; Smigocki, A. and Bohnert, H. 1995.** Light-induced expression of *ipt* from *Agrobacterium tumefaciens* results in cytokinin accumulation and osmotic stress symptoms in transgenic tobacco. *Plant. Mol. Biol.* 27: 225-235.
- Thorpe, A.T. 1981.** Methods and Applications in Agriculture. Academic Press. Plant Tissue Culture.
- Tomé, G. A. 1947.** La alfalfa en la Argentina. *Anales Soc. Rural Arg.* 81:82-90.
- Tzifra, T. ; Li, J. ; Lacroix, B. and Citovsky, V. 2004.** *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends Genet.* 20:375-383.
- Van Haute, E.; H. Joos; M. Maes; G. Warren; M. Van Montagu and J. Schell. 1983.** Intergeneric transfer and exchange recombination of restriction fragments cloned in pBR322: a novel strategy for the reversed genetics of Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.* 2:411-418.
- Weaver, L.M.; Gan, S.; Quirino, B. and Amasino, R.M. 1998.** A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol. Biol.* 37:455-469.
- Weide, R.; Koornneef, M. and Zabel, P. 1989.** A simple nondestructive spraying assay for the detection of an active kanamycin resistance gene in transgenic tomato plant. *Theoretical and Applied Genetics* 78. 169-172.
- Went, F.W. and Thimann, K.V. 1937.** "Phytohormones". Macmillan.
- Wen-Jun, S. and Forde, B. 1989.** Efficient transformation of *Agrobacterium spp.* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* 17:8385.
- White, P. R. 1934.** Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol.* 9:585-600.
- Wigdorovitz, A.; Mosgovoij, M.; Dus Santos, M.; Parreño, V.; Gómez, C.; Pérez-Filgueira, D.M.; Trono, K.; Rios, R.; Franzone, P.; Fernández, F.; Carrillo, C.; Babiuk, L.; Escribano, J.A. and Borca, M. 2004.** Protective lactogenic immunity

conferred by an edible peptide vaccine to bovine rotavirus produced in transgenic plants. *Journal of General Virology* 85: 1825-1832.

Wood, D.W.; Setubal J.C.; Kaul, R.; Monks, D.E.; Kitajima, J.P.; Okura, V.K.; Zhou, Y.; Chen, L.; Wood, G.E.; Almeida N.F. Jr.; L. Woo; Y. Chen; I.T. Paulsen; J.A. Eisen; P.D. Karp; D. Bovee Sr.; P. Chapman; J. Clendenning; G. Deatherage; W. Gillet; Ch. Grant; T. Kutayavin; R. Levy; M.J. Li; E. McClelland; A. Palmieri; Ch. Raymond; G. Rouse; Ch. Saenphimmachak; Z. Wu; P. Romero; D. Gordon; S. Zhang; H. Yoo; Y. Tao; P. Biddle; M. Jung; W. Krespan; M. Perry; B. Gordon-Kamm; L. Liao; S. Kim; C. Hendrick; Z.Y. Zhao; M. Dolan; F. Chumley; S.V. Tingey; J.F. Tomb; M.P. Gordon; M.V. Olson and E.W. Nester. 2001. The Genome of the Natural Genetic Engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294, 2317-2323.

Yu, F.; Van Deynze, A. and Pauls, P. 1993. Random amplified polymorphic DNA analysis. En: *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. Glick B. Y Thompson J. (eds). CRC Press. Boca Raton, USA. p. 287-301.

Zavaleta-Mancera, H.A.; Franklin, K.A.; Ougham, H.J.; Thomas, H. and Scoot, I.M. 1999. Regreening of *Nicotiana* leaves, I Reappearance of NADPH protochlorophyllide oxidoreductase and light-harvesting chlorophyll *a/b* binding protein. *J Exp. Bot.* 50:1677-1682.

ANEXO 1

- Protocolos

A 1.1- Transformación de *A. tumefaciens*

Se utilizó el protocolo descrito por Wen-jun y Forde (1989)

- 1- Se homogenizan 2,5 a 10 ng de ADN con 40 µl de células electrocompetentes. Se transfieren a una cuba de electroporación.
- 2- Se pasa un pulso de corriente con las siguientes características: Resistencia: 400 Ω; Capacitancia: 25 µF; Voltaje: 2,5 v.
- 3- Rápidamente se agrega 1 ml de medio YMB (manitol 10g/l, K₂HPO₄ 0,5g/l, extracto de levadura 0,4g/l, ClNa 0,5g/l, SO₄Mg.7H₂O 0,5g/l, pH 7-7,2), para recuperar la bacteria.
- 4- Se homogeniza y se transfiere a un frasco estéril.
- 5- Se deja incubando durante 3 horas a 28°C en agitación a 300 rpm.
- 6- Se realizan diluciones y se cultivan en medio semisólido MinA (K₂HPO₄ 5,25g/l, KH₂PO₄ 2,25g/l, (NH₄)₂SO₄ 0,5g/l, Citrato de sodio dihidratado 0,25g/l, MgSO₄.7H₂O 0,1g/l, glucosa 1g/l, pH 7) con los antibióticos adecuados.(*).
- 7- Se incuba durante 3 días a 28°C.

(*) Los antibióticos empleados fueron los siguientes:

LBA4404:

Rifampicina; el gen de resistencia es cromosómico [100 mg/l].

Estreptomycin; el gen de resistencia se encuentra en el plásmido *helper* [300 mg/l].

Espectinomycin; el gen de resistencia está en el vector binario [100 mg/l].

AGL1:

Carbenicilina; el gen de resistencia se encuentra en el plásmido *helper* [100 mg/l].

Espectinomycin; el gen de resistencia está en el vector binario [100 mg/l].

C58C1Rif pGV2260:

Rifampicina; el gen de resistencia es cromosómico [100 mg/l].

Carbenicilina; el gen de resistencia se encuentra en el plásmido *helper* [100 mg/l].

Espectinomycin; el gen de resistencia está en el vector binario [100 mg/l].

A 1.2- Extracción de ADN de *A. tumefaciens*

Se utilizó el protocolo ajustado en el Laboratorio de Biotecnología de Forrajeras del IGEAF.

- 1- Tomar 500 µl de cultivo saturado y centrifugar 5 minutos a temperatura ambiente a 13.400 g o tomar una colonia fresca de una placa de cultivo con un tip estéril.
- 2- Resuspender el pellet o la colonia en 50 µl de *buffer* TTE (1% Triton X-100; 2mM EDTA pH: 8; 20mM Tris ClH pH: 8; H₂O destilada). Vortexear.
- 3- Incubar a 95°C durante 10 minutos para producir la lisis bacteriana.
- 4- Enfriar a 4°C por unos segundos.
- 5- Centrifugar 5 minutos a temperatura ambiente a 13.400 g.
- 6- Utilizar 2,5 µl como muestra para analizar por PCR.

A 1.3- Extracción de ADN vegetal

Se utilizó el protocolo descripto por Yu *et al.* (1993)

- 1- Alicuotar 400 µl de *buffer* de extracción EB (1M Tris HCl pH: 7,4; 5M NaCl; 0,5M EDTA pH: 8; SDS 20%; H₂O destilada) en tubos de 1,5 ml.
- 2- Colocar una muestra de tejido (disco de hojas de 1 centímetro de diámetro).
- 3- Dejar reposar 1 hora a temperatura ambiente.
- 4- Machacar y dejar reposar 30 minutos a 1 hora a temperatura ambiente.
- 5- Centrifugar a 16.100 g durante 1 minuto.
- 6- Tomar 300 µl de sobrenadante y agregar 300 µl de isopropanol frío.
- 7- Homogeinizar suavemente.
- 8- Dejar reposar durante 10 minutos en frío.
- 9- Centrifugar a 16.100 g durante 1 minuto a 4°C.
- 10- Descartar el sobrenadante y dejar secar, escurrir sobre papel absorbente durante 10 minutos.
- 11- Lavar con 100 µl de etanol frío al 76%.
- 12- Centrifugar a 16.100 g durante 2,5 minutos a 4°C.
- 13- Descartar el sobrenadante y dejar escurrir el tubo sobre papel hasta evaporación total del alcohol.
- 14- Agregar 100 µl de HPLC o TE[1] (1M Tris HCl pH: 8; 0,5M EDTA pH: 8).
- 15- Dejar toda la noche para la redisolución a 4°C.
- 16- Centrifugar a 16.100 g durante 1 minuto a 4°C.
- 17- Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo limpio y descartar el pellet.

A 1.4- Extracción de ARN

Se utilizó el protocolo ajustado en el Laboratorio de Biotecnología de Forrajas del IGEAF.

- 1- Pesar 100 mg de foliolos, colocar en tubo eppendorf de 1,5 ml en N₂ líquido.
- 2- Machacar en frío el tejido con pistón.
- 3- Agregar 500 µl de Trizol frío y continuar machacando.
- 4- Agregar nuevamente 500 µl de Trizol.
- 5- Vortexear.
- 6- Reposar en hielo.
- 7- Centrifugar 10 minutos a 13.400 g a 4°C.
- 8- Tomar sobrenadante y agregar 200 µl de Cloroformo.
- 9- Vortexear al máximo 15 segundos.
- 10- Reposar 3 minutos en hielo.
- 11- Centrifugar 10 minutos a 13.400 g a 4°C.
- 12- Tomar sobrenadante y repetir desde el punto 8.
- 13- Agregar 250 µl de *buffer* (0,8 M Na citrato; 1,2 M NaCl; H₂O cartucho con DEPC 0,1%).
- 14- Vortexear.
- 15- Agregar 250 µl de Isopropanol.
- 16- Vortexear.
- 17- Reposar 10 minutos en hielo (se puede guardar a -20°C).
- 18- Centrifugar 15 minutos a 13.400 g a 4°C.
- 19- Tomar sobrenadante con micropipeta de 1000 µl, dar un *spin* y luego sacar el resto con micropipeta de 100µl.
- 20- Agregar 1000 µl de EtOH 70% (hecho con H₂O ARNs free). Puede quedar a -20°C.
- 21- Centrifugar 5 minutos a 4.800 g a 4°C.

- 22- Retirar EtOH con micropipeta.
- 23- Secar en flujo 10 minutos.
- 24- Agregar 50 μ l de H₂O libre de ARNsa y colocar 15 minutos a 55°C (vortexear cuando se calentó).
- 25- Una vez resuspendido el ARN, centrifugar 30 minutos a 16.100 g a 4°C.
- 26- Tomar el sobrenadante y guardar a -20 °C.

A 1.5- Detección de la actividad transcripcional por RT-PCR con kit Ge Healthcare

Se procedió de acuerdo a las indicaciones técnicas del proveedor del Kit (Ready-to-Go™ DNA Labeling Beads (-dCTP) (*GE Healthcare RT-PCR Beads*).

- 1- Preparar controles negativos o sin residuos de DNA.
 - 1.1- Agregar 47 μ l de HPLC a temperatura ambiente en cada tubo.
 - 1.2- Colocar los tubos en hielo por 5 minutos para disolver la bolita, luego homogeneizar las muestras con pipeta.
 - 1.3- Incubar a 95°C por 10 minutos (para inactivar la transcriptasa reversa).
- 2- Preparar muestras para analizar
 - 2.1- Agregar 47 μ l de HPLC a temperatura ambiente en cada tubo.
 - 2.2- Colocar los tubos en hielo por 5 minutos para disolver la bolita, luego homogeneizar las muestras con pipeta.
- 3- Agregar a cada tubo de los controles negativos y muestras para analizar.
 - 1 μ l del *primers ipt (up)*.
 - 1 μ l del *primers ipt (lower)*.
 - 3 μ l de ARN digerido.
- 4- Incubar a 42°C por 30 minutos.
- 5- Ciclar con el programa correspondiente a *ipt* (tabla 9)

A 1.6- Purificación del producto de PCR (Sonda)

Se procedió de acuerdo a las indicaciones técnicas del proveedor del *kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-up System Promega*

- 1- Adicionar igual volumen de solución *binding* de membrana, que producto de PCR obtenido.
- 2- Insertar la minicolumna en el tubo de recolección y transferir la mezcla del producto de PCR y la solución a la minicolumna.
- 3- Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.
- 4- Centrifugar por 1 minuto a 16.000 g y descartar líquido recolectado. Reinsertar la minicolumna.
- 5- Agregar 700 μ l de solución de lavado de membrana (con etanol adicionado), centrifugar por 1 minuto a 16.000 g, descartar líquido recolectado.
- 6- Repetir el lavado de membrana con 500 μ l de solución de lavado de membrana, centrifugar por 5 minutos a 16.000 g, descartar líquido recolectado.
- 7- Centrifugar por 1 minuto a 16.000 g para eliminar residuos de etanol de la solución de lavado.
- 8- Transferir la minicolumna a un tubo limpio de 1,5 ml, agregar 50 μ l de H₂O libre de nucleasas. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar por 1 minuto a 16.000 g.
- 9- Conservar a -20°C.

A 1.7- Cuantificación de la sonda

Se utilizó un fluorómetro *Qubit® fluorometer Invitrogen*. Se procedió de acuerdo a las indicaciones técnicas del proveedor del *Qubit™ Quantitation Starter Kit Invitrogen*.

Se utilizaron los reactivos específicos para cuantificación de productos de PCR.

- 1- Tomar 199 µl de solución *buffer Quant-iT™* por cada muestra a cuantificar.
- 2- Agregar 1 µl de reactivo *Quant-iT™* por cada muestra a cuantificar.
- 3- Homogeneizar y alicuotar 199 µl por cada tubo de muestra a cuantificar.
- 4- Agregar 1 µl de muestra obtenida en el punto 5.4.3.3.
- 5- Homogeneizar e incubar 2 minutos a temperatura ambiente.
- 6- Colocar en el equipo el tubo con la muestra a cuantificar y medir.

Todo el procedimiento se hace cubriendo los tubos con papel metalizado evitando el contacto directo con la luz para evitar degradación del reactivo *Quant-iT™*.

A 1.8- Extracción de ADN vegetal

Se utilizó el protocolo descrito en el manual del CIMMYT (2005).

- 1- Colocar el tejido vegetal (folíolos jóvenes) cosechado en tubos de 50 ml con tapa perforada y sumergirlos en N₂ líquido. Enfriar los morteros con N₂ líquido.
- 2- Machacar 4 g de tejido con el mortero, evitando que se descongele.
- 3- Colocar el tejido molido en un tubo de 50 ml. Agregar 12,5 ml del *buffer* CTAB [2x] (100mM Tris HCl pH=8; 20mM EDTA pH: 8; 1,4M NaCl; 2% CTAB p/v), precalentado a 60°C; 250 µl 2-mercaptoetanol 14 M y 2,5 g de CTAB en polvo. Vortexear.
- 4- Colocar en baño termostatzado con agitación a 60°C, durante 75 minutos.
- 5- Colocar mitad de volumen de cloroformo-octanol (24:1), una vez que la temperatura descendió. Agitar suavemente hasta lograr un verde homogéneo.
- 6- Centrifugar a 1.831 g durante 15 minutos (centrifuga basculante SIGMA 4K15)
- 7- Recoger el sobrenadante en un nuevo tubo.
- 8- Repetir los pasos 5, 6 y 7.
- 9- Incubar el sobrenadante con 50 µl RNAsa 10x (10 mg/ml) durante 15 minutos a 37°C.
- 10- Agregar un volumen de isopropanol (12.5 ml) en forma circular y agitar de la misma forma. Se observa como se forma una medusa, la solución debe ser límpida.
- 11- Introducir un *hook*, haciéndolo girar en forma circular para enredar el ADN, sin tocar los bordes del tubo.
- 12- Colocar el *hook* con el ADN en un tubo con 3 ml. de EtOH 76%, AcoNa 0,2 M durante 20 minutos a temperatura ambiente (lavado).
- 13- Introducir 15 veces en forma suave en la segunda solución de lavado de EtOH 76%, AcoNH₄⁺ 10 mM.
- 14- Colocar el *hook* invertido en una gradilla para secado.
- 15- Una vez seco se coloca el *hook* en un eppendorf con 0,5 - 1 ml. de *buffer* TE [0,1x], dependiendo de la cantidad de ADN logrado.
- 16- Agitar para lograr la disolución del ADN, se retira el *hook*.

A 1.9- Cuantificación de ADN vegetal

Se utilizó un fluorómetro *Qubit® fluorometer Invitrogen*. Se procedió de acuerdo a las indicaciones técnicas del proveedor de *Qubit™ Quantitation Starter Kit Invitrogen*.

Se utilizaron los reactivos específicos para la cuantificación de ADN.

- 1- Tomar 199 µl de solución *buffer Quant-iT™* por cada muestra a cuantificar
- 2- Agregar 1 µl de reactivo *Quant-iT™* por cada muestra a cuantificar

- 3- Homogeneizar y alicuotar 199 μ l por cada tubo de muestra a cuantificar
- 4- Agregar 1 μ l de muestra obtenida en el punto 5.4.3.5.
- 5- Homogeneizar e incubar 2 minutos a temperatura ambiente.
- 6- Colocar en el equipo el tubo con la muestra a cuantificar y medir.

Todo el procedimiento se hace cubriendo los tubos con papel metalizado evitando el contacto directo con la luz para evitar degradación del reactivo *Quant-iTTM*.

A 1.10- Purificación del ADN digerido

Se utilizó el protocolo de purificación de ADN con cloroformo y precipitación, siguiendo las indicaciones del prospecto de *Trizol Reagent de Invitrogen*.

- 1- Agregar 200 μ l de cloroformo al tubo que contiene el ADN digerido y sin digerir.
- 2- Vortexear suave.
- 3- Centrifugar 10 minutos a 1.500 g.
- 4- Agregar 2,5 volúmenes EtOH.
- 5- Incubar 2 horas a -20°C .
- 6- Centrifugar 20 minutos máxima velocidad.
- 7- Lavar con EtOH 70% frío.
- 8- Secar el pellet en flujo y luego unos segundos a 65°C .
- 9- Resuspender en 30 μ l de TAE [1x], calentar a 65°C , pasar a hielo antes de sembrar.

A 1.11- Transferencia a membrana de nylon

- 1- Depuración (0,25 M HCl) 12 minutos con agitación suave, eliminar solución y enjuagar con H_2O destilada. (controlar coloración del bromofenol, cuando cambia a amarillo eliminar solución si no pasaron los 12 minutos).
- 2- Desnaturalización (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M) 30 minutos con agitación suave, eliminar solución y enjuagar con H_2O destilada.
- 3- Neutralización (Tris-HCl 0,5 M pH: 7,5; NaCl 2,5 M) 30 minutos con agitación suave. Equilibrar en SSC [20x] (*Standard Saline Citrate*) (NaCl 3 M; citrato de Na 0,3 M pH: 7) 10 minutos con agitación suave.
- 4- Transferencia en SSC [20x] durante 18 horas, con papel secante. (Figura 7).
- 5- Chequear la transferencia en el transluminador, luego pasar a SSC [5x] 10 minutos.

A 1.12- Fijación del ADN a la membrana de nylon

- 1- Se coloca la membrana en SSC [5x] 10 minutos con agitación suave.
- 2- UV- *crosslinking* (ambos lados). Energía 120000 $\mu\text{joule}/\text{cm}^2$ o 30 seg. $\lambda = 253$ nm.
- 3- Pasar la membrana rápidamente a SSC [2x].

A 1.13- Hibridación de la sonda al ADN

- 1- Pre-hibridar 3 horas (mínimo) a 65° - 68°C en solución *buffer strandard hybridization* (Anexo A 3.5 p185). El volumen de Pre-hibridación: 20 ml (agregar 120 μ l Herring DNA desnaturalizado [Herring 10mg/ml]). Colocar membrana con el ADN hacia adentro, no deben haber burbujas.
- 2- Calentar la sonda a 95°C 10 minutos y enfriar en hielo.
- 3- Hibridar con la sonda durante 18 horas a 65° - 68°C . El volumen de hibridación es de 10 ml. ([sonda 12ng/ml *buffer* de hibridación]).

A 1.14- Detección de la sonda

1. Lavar la membrana 2 veces con solución de lavado [2x] (SSC [2x]; SDS 0,1%) (Anexo A 3.5 p185) durante 5 minutos, agitando suavemente.
2. Lavar la membrana con solución de lavado [0,2x] durante 15 minutos a 68°C, agitando suavemente (SSC [0,2x]; SDS 0,1%) (Anexo A 3.5 p185).
3. Lavar la membrana con solución de lavado [0,1x] durante 15 minutos a 68°C, agitando suavemente (SSC [0,1x]; SDS 0,1%) (Anexo A 3.5 p185).
4. Equilibrar la membrana en *buffer* de lavado (*buffer* ácido maleico (w/v); 0,3 Tween 20) (Anexo A 3.5 p185) 5 minutos, agitando suavemente.
5. Bloquear la membrana en solución bloqueante *Buffer* (solución *blocking reagent* stock 1/10 en solución *buffer* ácido maleico) durante 30-60 minutos, agitando suavemente (Anexo A 3.5 p185).
6. Diluir anti-DIG-AP 1:15.000 en solución bloqueante. Centrifugar el vial 5 minutos a 15.700 g. Tomar una alícuota en flujo antes de usar. (Solución bloqueante 50 µl; anti-DIG-AP 3,3 µl).
7. Incubar la membrana 30 minutos, agitando suavemente.
8. Lavar 4 veces la membrana con solución *buffer* de lavado durante 10 minutos cada uno.
9. Equilibrar la membrana con *buffer* de detección (Tris-HCl pH: 9,5 100mM; NaCl 100mM) 5 minutos.
10. Sacar el exceso de *buffer* de detección, colocándolo en superficie de vidrio.
11. Incubar con el CDP-star (30-40 µl/cm² blot) durante 4 minutos.
12. Sacar el exceso de CDP-star y colocar la membrana entre 2 placas de acetato.

A 1.15- Estripeno de la membrana

- 1- Lavar la membrana en agua destilada 1 minuto.
- 2- Incubar en solución de estripeno alcalina 2 veces durante 10 minutos cada uno, a 37°C (NaOH 0,2 N; SDS 0,1%) (Anexo A 3.5 p185).
- 3- Enjuagar la membrana en SSC [2x].
- 4- Colocar la membrana en bolsita sellada y guardarlo a 4°C.

A 1.16- Desinfección y siembra del material a evaluar

- 1- Prelavar con agua corriente los folíolos cortados por 10 minutos.
- 2- Agregar 2 gotas de Tween 20 y enjuagar con agua destilada 3 veces.
- 3- En flujo laminar desinfectar por inmersión en cloro activo (hipoclorito de sodio) al 0,6 o 0,3% y agitar 10 o 15 minutos a 250-300 rpm.
- 4- Enjuagar con agua destilada estéril 3 veces y escurrir el exceso sobre papel de filtro estéril.
- 5- Sembrar las hojas en placas de Petri que contienen como soporte el medio de cultivo agar-agua 6% (p/v) o papel de filtro estéril humedecido con agua estéril.

A 1.17- Extracción de clorofila

Se aplicó el protocolo utilizado por Matthew *et al.* (2001). Se utiliza el folíolo derecho y el izquierdo de cada hoja a evaluar.

- 1- Tomar un disco de 1 centímetro de diámetro (proveniente de la -70°C) y machacar con pistón.
- 2- Agregar 1 ml de Acetona 80% (v/v), homogeneizar con vortex.
- 3- Incubar en oscuridad a temperatura ambiente (25°C) por 30 minutos, homogenizando por inversión del tubo cada 10 minutos.

- 4- Centrifugar a 9.300 g por 5 minutos.
- 5- Tomar 1 ml de sobrenadante y pasar a tubo eppendorf limpio.
- 6- Medir clorofila *a* y *b* con espectrofotómetro.

A 1.18- Extracción proteínas foliares

Se utilizó el protocolo ajustado en el Laboratorio de Biotecnología de Forrajeras del IGEAF. Se utilizó el folíolo central de las hojas evaluadas.

- 1- Tomar un disco de 1 centímetro de diámetro (proveniente de la -70°C) y machacar con pistón.
- 2- Agregar 100 μl de *buffer* de extracción (TBS [1x] 100 μl + PMSF 1 μl por muestra).
- 3- Centrifugar a 13.400 g por 15 minutos a 4°C .
- 4- Tomar sobrenadante y colocar en tubo limpio.

Tomar una alícuota de 20 μl para medir proteínas totales y el resto conservar para evaluar el perfil de la subunidad mayor de la proteína Rubisco en gel SDS-PAGE.

A 1.19- Cuantificación de proteínas solubles totales

Se utilizó un fluorómetro *Qubit® fluorometer Invitrogen*. Se procedió de acuerdo a las indicaciones técnicas del proveedor del *Qubit™ Quantitation Starter Kit Invitrogen*.

Se utilizaron los reactivos específicos para cuantificación de proteínas.

1. Tomar 199 μl de solución *buffer Quant-iT™* por muestras a cuantificar.
2. Agregar 1 μl de reactivo *Quant-iT™* por muestra a cuantificar.
3. Homogenizar y alicuotar 199 μl por tubo de muestra a cuantificar.
4. Agregar 1 μl de muestra obtenida en el punto 5.6.3.1.
5. Homogenizar e incubar 2 minutos a temperatura ambiente.
6. Colocar en el equipo el tubo con la muestra a cuantificar y medir.

Todo el procedimiento se hace cubriendo los tubos con papel metalizado evitando el contacto directo con la luz para evitar degradación del reactivo *Quant-iT™*.

A 1.20-Preparación geles SDS-PAGE

- 1- Preparar el gel separador al 4%, agregar con pipeta lentamente (evitar formación de burbujas).
- 2- Agregar agua HPLC con pipeta para nivelar la superficie del gel. Esperar que solidifique.
- 3- Eliminar el agua HPLC.
- 4- Colocar el peine para formar los pocillos.
- 5- Preparar el gel concentrador al 10%, agregar con pipeta lentamente (evitar formación de burbujas). Esperar que solidifique y retirar el peine.

ANEXO 2

-Resultados porcentaje de contaminación y concentración de ADN, cálculos digestión *Southern*, cuantificación Clorofila *a* y *b* – Proteínas Foliare Totales – Salidas estadístico SAS

A 2.1- Valores de absorbancia, porcentaje de contaminación, concentración y volumen a utilizar en la reacción de digestión con ADNs.

Muestras	Absorbancia		% Contaminación ADN [A 260/ A 280]	[ARN] Real µg/µl	Volumen a utilizar
	260 nm	280 nm			
C2-3	0,1751	0,0872	2,01	1,40	18
sene 4	0,3207	0,1565	2,05	2,57	10
sene 5	0,1377	0,0712	1,93	1,10	23
sene 9	0,1299	0,0650	2,00	1,04	24
sene 10	0,2235	0,1097	2,04	1,79	14
sene 11	0,1462	0,0726	2,01	1,17	21
sene 12	0,1247	0,0690	1,81	1,00	25

A 2.2- Concentraciones de los ADNs de las muestras para *Southern*.

Muestras	Concentración (µg/ml)
C2-3	541
sene 4	562
sene 10	721
sene 12	619

A 2.3 - Cálculos de µl de ADN a utilizar para las reacciones con y sin enzima (*HindIII*).

Muestras	Concentración µg /ml	Cantidad de µl de ADN para [15 µg] finales
C2-3	541	28 µl
sene 4	562	27 µl
sene 10	721	21 µl
sene 12	619	24 µl

A 2.4- Características de las reacciones de digestión de los ADNs para *Southern*.

Reactivos	Concentración final digerido	Concentración final sin digerir
Buffer de la enzima [10x]	0,1 µl/µl	0,1 µl/µl
Enzima	0,2 u/µl	0,2 u/µl
BSA	0,1 mg/ml	-
ADN	54 ng/µl	37 ng/µl

A 2.5- Resultados cuantificación clorofila *a* y *b* expresado en μg de clorofila/ml de solución ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)

Fórmulas cálculo clorofila *a* y *b*

$$\text{Clorofila a: } (\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}) = [(12,25 \times A_{663,6}) - (2,55 \times A_{646,6})]$$

$$\text{Clorofila b: } (\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}) = [(20,31 \times A_{646,6}) - (4,91 \times A_{663,6})]$$

* Experimento I

Mediciones de clorofila *a* y *b* realizadas a los 0, 21 y 35 días. Resultados luego de la aplicación de las ecuaciones de Porra *et al.* (1989). Unidad de medida $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

	Bloque 1		Bloque 2		Bloque 3		Bloque 4	
Día 0	clorofila <i>a</i>	clorofila <i>b</i>	clorofila <i>a</i>	clorofila <i>b</i>	clorofila <i>a</i>	clorofila <i>b</i>	clorofila <i>a</i>	clorofila <i>b</i>
C2-3	16,87	6,50	14,08	5,16	19,21	6,24	22,43	7,08
C2-3	14,23	5,12	11,65	4,42	18,33	6,80	20,93	7,63
sene 4	22,90	10,37	16,84	10,36	10,33	5,67	15,79	6,23
sene 4	20,90	8,28	8,44	13,30	15,69	9,07	21,56	8,53
sene 5	18,28	7,33	11,49	5,22	19,48	8,24	21,12	8,49
sene 5	22,48	9,69	13,50	7,73	18,09	8,68	12,79	4,83
sene 9	8,10	2,98	12,07	4,36	20,94	8,52	17,89	8,03
sene 9	6,45	2,38	11,45	4,02	12,83	11,04	19,26	7,14
sene 10	8,84	3,47	20,10	7,86	20,66	8,19	21,92	8,71
sene 10	9,41	3,65	17,16	6,58	20,99	8,96	19,74	16,20
sene 11	13,57	5,01	14,49	5,23	16,62	9,61	23,70	10,00
sene 11	17,61	6,76	15,12	5,40	16,62	9,61	16,12	6,62
sene 12	20,81	9,18	15,43	5,76	17,75	6,46	18,13	18,30
sene 12	22,89	10,37	14,10	5,92	20,89	8,55	25,81	13,79
Día 21	clorofila <i>a</i>	clorofila <i>b</i>	clorofila <i>a</i>	clorofila <i>b</i>	clorofila <i>a</i>	clorofila <i>b</i>	clorofila <i>a</i>	clorofila <i>b</i>
C2-3	18,60	6,70	15,76	6,00	19,11	6,80	22,37	10,09
C2-3	17,60	6,03	17,18	6,58	16,65	6,02	20,13	7,84
sene 4	13,96	4,72	13,61	4,74	15,18	4,97	15,57	5,45
sene 4	18,47	6,29	20,23	7,57	17,20	5,83	13,99	4,85
sene 5	18,94	6,70	15,15	6,15	13,09	4,88	13,84	5,16
sene 5	19,06	6,98	12,99	5,03	13,26	4,68	14,23	4,95
sene 9	14,88	5,19	18,64	7,18	9,82	3,38	18,28	7,19
sene 9	13,92	4,71	17,02	6,42	22,25	8,94	20,20	8,53
sene 10	8,98	3,25	6,38	3,00	14,88	5,90	12,42	4,26
sene 10	9,16	3,36	6,05	2,58	13,65	5,19	16,91	5,94

sene 11	10,22	2,59	20,37	8,07	14,26	4,92	14,68	4,67
sene 11	10,47	2,75	22,66	9,20	21,09	7,91	7,15	2,33
sene 12	18,23	6,53	9,46	4,32	22,71	9,64	18,10	6,76
sene 12	12,84	4,37	13,75	5,97	21,74	8,75	21,96	9,15
Día 35	clorofila a	clorofila b	clorofila a	clorofila b	clorofila a	clorofila b	clorofila a	clorofila b
C2-3	1,54	1,65	1,15	1,33	2,62	1,02	5,24	2,56
C2-3	1,28	1,34	1,08	1,40	4,68	1,95	2,40	2,17
sene 4	2,37	2,31	1,81	2,38	5,35	2,05	6,70	3,60
sene 4	1,71	1,73	2,12	2,53	6,19	2,60	6,59	3,54
sene 5	1,38	1,64	1,48	1,87	3,39	1,29	5,87	2,09
sene 5	1,19	1,31	0,82	1,29	3,58	1,49	6,32	3,00
sene 9	1,15	1,40	1,37	1,56	7,49	3,30	5,22	1,90
sene 9	1,33	1,96	2,24	2,77	8,43	4,70	5,37	2,52
sene 10	3,78	5,86	1,20	1,48	6,09	2,99	6,74	4,75
sene 10	1,49	1,62	1,08	1,30	6,34	3,79	4,61	4,07
sene 11	1,37	1,20	1,11	0,98	7,05	3,07	3,81	1,95
sene 11	1,28	1,28	1,86	1,89	7,32	3,06	7,38	3,99
sene 12	1,90	2,09	0,81	0,94	6,47	4,27	3,88	2,92
sene 12	1,02	1,01	1,66	1,93	5,60	2,96	4,79	6,07

* Experimento II

Mediciones de clorofila *a* y *b* realizadas a los 0, 14, 21 y 35 días. Resultados luego de la aplicación de las ecuaciones de Porra *et al.* (1989). Unidad de medida $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

		Bloque 1		Bloque 2	
		Día	clorofila <i>a</i>	clorofila <i>b</i>	clorofila <i>a</i>
sene 4	0	24,05	9,20	19,21	6,98
sene 4	0	22,45	7,96	18,84	6,65
sene 5	0	22,84	8,05	22,59	8,58
sene 5	0	21,11	7,08	21,46	7,82
sene 9	0	23,33	7,94	17,15	5,78
sene 9	0	22,98	8,00	16,61	5,79
sene 10	0	20,47	6,62	13,73	4,46
sene 10	0	22,16	7,64	16,33	5,41
sene 11	0	19,85	6,66	21,38	7,49
sene 11	0	19,38	6,60	23,29	9,22
sene 12	0	21,20	7,23	17,68	6,02
sene 12	0	23,10	8,59	15,87	5,41
sene 4	14	23,88	9,37	19,01	5,82
sene 4	14	14,00	4,34	19,16	6,10
sene 5	14	18,92	6,18	16,27	5,22
sene 5	14	15,87	5,18	16,69	5,10
sene 9	14	21,01	7,57	12,53	3,96
sene 9	14	22,35	8,28	10,53	3,18
sene 10	14	16,17	5,83	11,03	3,60
sene 10	14	13,67	4,96	9,73	3,04
sene 11	14	19,43	5,94	22,91	8,33
sene 11	14	20,87	6,70	16,87	5,21

sene 12	14	20,19	8,43	17,47	6,38
sene 12	14	13,93	5,18	18,90	6,68
sene 4	21	19,06	6,79	14,73	4,46
sene 4	21	22,45	8,23	15,05	4,42
sene 5	21	16,52	5,37	11,30	3,21
sene 5	21	11,89	3,62	13,87	4,32
sene 9	21	3,31	1,24	4,87	1,80
sene 9	21	5,21	2,06	4,37	1,67
sene 10	21	14,03	4,83	9,04	3,01
sene 10	21	11,27	3,94	9,25	3,43
sene 11	21	13,00	3,70	11,62	3,64
sene 11	21	14,84	4,40	12,95	3,31
sene 12	21	17,78	6,43	16,85	5,39
sene 12	21	17,85	6,52	14,11	4,42
sene 4	35	19,26	7,42	5,13	1,07
sene 4	35	21,53	8,46	4,32	0,88
sene 5	35	2,34	0,99	4,93	1,18
sene 5	35	2,48	1,03	4,99	1,23
sene 9	35	0,02	0,04	0,56	0,78
sene 9	35	3,30	1,08	0,22	0,30
sene 10	35	3,99	1,17	11,82	3,19
sene 10	35	3,54	1,17	11,46	3,15
sene 11	35	5,59	1,58	5,66	1,23
sene 11	35	9,77	2,81	10,15	2,14
sene 12	35	12,60	4,37	9,05	2,31
sene 12	35	16,18	5,88	11,32	2,88

A 2.6- Resultados cuantificación Proteínas Foliare Totales expresadas en mg/ml

* Experimento I

Proteínas totales a los 0 y 35 días de iniciado el experimento. Bloques 1, 2, 3 y 4. Plantas transgénicas y controles no transgénicas. Muestras desde la 1ª a la 9ª hoja. Unidad de medida mg/ml.

	Bloque 1		Bloque 2		Bloque 3		Bloque 4	
	Día 0	Día 35	Día 0	Día 35	Día 0	Día 35	Día 0	Día 35
C2-3	1,71	1,56	1,78	1,69	1,25	1,03	1,43	1,05
Sene 4	1,79	1,71	1,89	1,46	1,53	1,30	1,46	1,15
Sene 5	1,50	1,02	1,81	1,10	1,30	1,09	1,48	1,34
Sene 9	1,49	1,00	1,61	1,33	1,45	1,15	1,49	1,35
Sene 10	1,29	1,02	2,11	1,46	1,32	1,12	1,47	1,29
Sene 11	1,59	1,24	1,81	1,56	1,54	1,33	1,50	1,30
Sene 12	1,78	1,71	1,82	1,58	1,45	1,33	1,57	1,57

* Experimento II

Proteínas totales a los 0 y 35 días de iniciado el experimento. Bloques 1 y 2. Plantas transgénicas y controles no transgénicas. Muestras 6ª y 7ª hoja Unidad de medida mg/ml.

	Bloque I		Bloque II	
	Día 0	Día 35	Día 0	Día 35
sene 4	1,86	1,49	1,18	1,15
sene 5	1,43	0,97	1,25	1,15
sene 9	2,20	0,45	1,42	0,32
sene 10	1,80	1,56	1,40	1,15
sene 11	1,86	1,24	1,49	1,19
sene 12	2,06	1,17	1,44	1,30

A 2.7- Salida análisis estadístico ANOVA y Test de comparación de media Tukey – SAS

A 2.7.1- Análisis de Clorofila *a* y *b* – Experimentos 1 y 2

A 2.7.1.1- Experimento 1 – Bloque I, II, III y IV - Clorofila *a*

A 2.7.1.1.1- Clorofila *a* día 0 bloques I, II, III y IV

Class Level Information								
Class	Levels	Values						
tratamientos	7	C23 sene10 sene11 sene12 sene4 sene5 sene9						
bloques	4	1 2 3 4						

Number of observations 56

Dependent Variable: cloroA

Sum of					
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	401.518982	44.613220	2.92	0.0081
Error	46	703.787954	15.299738		
Corrected Total	55	1105.306936			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	cloroA Mean
0.363265	23.18459	3.911488	16.87107

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tratamientos	6	143.7030607	23.9505101	1.57	0.1788
bloques	3	257.8159214	85.9386405	5.62	0.0023

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for cloroA

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	46
Error Mean Square	15.29974

Critical Value of Studentized Range	4.35923
Minimum Significant Difference	6.0285

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	tratamiento
A	19.476	8	sene12
A	17.353	8	sene10
A	17.216	8	C23
A	17.154	8	sene5
A	16.731	8	sene11
A	16.556	8	sene4
A	13.611	8	sene9

A 2.7.1.1.2- Clorofila *a* día 35 bloques I, II, III y IV

(Sin transformar)

		Class Level Information						
Class	Levels	Values						
Tratamientos	7	C23	sene10	sene11	sene12	sene4	sene5	sene9
Bloques	4	1	2	3	4			

Number of observations 56

Dependent Variable: clorofilaA

		Sum of			
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	247.8212857	27.5356984	24.17	<.0001
Error	46	52.4109643	1.1393688		
Corrected Total	55	300.2322500			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	clorofilaA Mean
0.825432	30.17420	1.067412	3.537500

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Tratamientos	6	18.5718500	3.0953083	2.72	0.0242
bloques	3	229.2494357	76.4164786	67.07	<.0001

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for clorofilaA

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	46
Error Mean Square	1.139369
Critical Value of Studentized Range	4.35923
Minimum Significant Difference	1.6451

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	tratamientos
A	4.1050	8	sene4
A	4.0750	8	sene9
A	3.9163	8	sene10

A	3.8975	8	sene11
A	3.2663	8	sene12
A	3.0038	8	sene5
A	2.4988	8	C23

(Transformados con **logaritmo de base 10**)

		Class Level Information						
Class	Levels	Values						
Tratamientos	7	C23	sene10	sene11	sene12	sene4	sene5	sene9
Bloques	4	1	2	3	4			

Number of observations 56

Dependent Variable: clorofilaAT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	4.85610908	0.53956768	33.26	<.0001
Error	46	0.74632611	0.01622448		
Corrected Total	55	5.60243519			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	clorofilaAT Mean
0.866785	28.86329	0.127375	0.441306

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tratamientos	6	0.29556561	0.04926094	3.04	0.0138
bloques	3	4.56054346	1.52018115	93.70	<.0001

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for clorofilaAT

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	46
Error Mean Square	0.016224
Critical Value of Studentized Range	4.35923
Minimum Significant Difference	0.1963

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	tratamientos
A	0.54460	8	sene4
B A	0.49279	8	sene10
B A	0.48993	8	sene9
B A	0.46506	8	sene11
B A	0.40553	8	sene12
B A	0.36912	8	sene5
B	0.32212	8	C23

A 2.7.1.2- Experimento 1 – Bloque I y II - Clorofila *a*

A 2.7.1.2.1- Clorofila *a* día 0 bloques I y II

Class	Class Level Information	
	Levels	Values
Tratamientos	6	sene10 sene11 sene12 sene4 sene5 sene9
Bloques	2	1 2

Number of observations 24

Dependent Variable: cloroA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	6	100.0792000	16.6798667	3.37	0.0225
Error	17	84.2329833	4.9548814		
Corrected Total	23	184.3121833			

R-Square 0.542987 Coeff Var 10.96845 Root MSE 2.225956 cloroA Mean 20.29417

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tratamientos	5	37.41718333	7.48343667	1.51	0.2387
bloques	1	62.66201667	62.66201667	12.65	0.0024

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for cloroA

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 17
 Error Mean Square 4.954881
 Critical Value of Studentized Range 4.52365
 Minimum Significant Difference 5.0347

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	tratamientos
A	22.000	4	sene5
A	21.138	4	sene4
A	20.975	4	sene11
A	20.018	4	sene9
A	19.463	4	sene12
A	18.173	4	sene10

A 2.7.1.2.2- Clorofila *a* día 35 bloques I y II

(Sin transformar)

Class	Class Level Information	
	Levels	Values
Tratamientos	6	sene10 sene11 sene12 sene4 sene5 sene9
Bloques	2	1 2

Number of observations 24

Dependent Variable: clorofilaA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	6	438.8763417	73.1460569	3.54	0.0185
Error	17	351.3751208	20.6691248		
Corrected Total	23	790.2514625			

R-Square 0.555363 Coeff Var 60.54711 Root MSE 4.546331 clorofilaA Mean 7.508750

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tratamientos	5	420.5188375	84.1037675	4.07	0.0130
bloques	1	18.3575042	18.3575042	0.89	0.3592

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for clorofilaA

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 17
 Error Mean Square 20.66912
 Critical Value of Studentized Range 4.52365
 Minimum Significant Difference 10.283

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	tratamientos
A	12.560	4	sene4
A	12.288	4	sene12
B A	7.793	4	sene11
B A	7.703	4	sene10
B A	3.685	4	sene5
B	1.025	4	sene9

(Transformados con **logaritmo de base 10**)

Class	Class Level Information
	Levels Values
Tratamientos	6 sene10 sene11 sene12 sene4 sene5 sene9
Bloques	2 1 2

Number of observations 24

Dependent Variable: cloroAT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	6	20.47929144	3.41321524	5.43	0.0027
Error	17	10.68738469	0.62866969		
Corrected Total	23	31.16667613			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	cloroAT Mean
0.657089	31.81710	0.792887	2.492015

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tratamientos	5	20.26719189	4.05343838	6.45	0.0016
bloques	1	0.21209955	0.21209955	0.34	0.5690

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for cloroAT

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	17
Error Mean Square	0.62867
Critical Value of Studentized Range	4.52365
Minimum Significant Difference	1.7934

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	tratamientos
A	3.4862	4	sene12
A	3.3430	4	sene4
A	2.7637	4	sene11
A	2.6756	4	sene10
B A	1.8897	4	sene5
B	0.7938	4	sene9

A 2.7.2.1- Experimento 1 – Bloque I, II, III y IV - Clorofila *b*

A 2.7.2.1.1- Clorofila *b* día 0 bloques I, II, III y IV

(Sin transformar)

Class	Class Level Information	
	Levels	Values
Tratamientos	7	C23 sene10 sene11 sene12 sene4 sene5 sene9
Bloques	4	1 2 3 4

Number of observations 56

Dependent Variable: clorofilaB

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	175.7706018	19.5300669	2.74	0.0118
Error	46	327.3576821	7.1164714		
Corrected Total	55	503.1282839			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	clorofilaB Mean
0.349355	34.77169	2.667672	7.671964

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tratamientos	6	91.68829643	15.28138274	2.15	0.0657

bloques	3	84.08230536	28.02743512	3.94	0.0139
---------	---	-------------	-------------	------	--------

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for clorofilaB

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	46
Error Mean Square	7.116471
Critical Value of Studentized Range	4.35923
Minimum Significant Difference	4.1115

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	tratamientos
A	9.791	8	sene12
A	8.976	8	sene4
A	7.953	8	sene10
A	7.526	8	sene5
A	7.280	8	sene11
A	6.119	8	C23
A	6.059	8	sene9

(Transformados con **logaritmo de base 10**)

Class Level Information								
Class	Levels	Values						
Tratamientos	7	C23	sene10	sene11	sene12	sene4	sene5	sene9
Bloques	4	1	2	3	4			

Number of observations 56

Dependent Variable: cloroBT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0.62850033	0.06983337	3.26	0.0038
Error	46	0.98559918	0.02142607		
Corrected Total	55	1.61409951			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	cloroBT Mean
0.389381	17.16486	0.146376	0.852768

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tratamientos	6	0.31385612	0.05230935	2.44	0.0392
bloques	3	0.31464421	0.10488140	4.90	0.0049

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for cloroBT

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	46
Error Mean Square	0.021426
Critical Value of Studentized Range	4.35923

Minimum Significant Difference 0.2256

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	tratamientos
A	0.95695	8	sene12
B A	0.93871	8	sene4
B A	0.86557	8	sene5
B A	0.85392	8	sene10
B A	0.84587	8	sene11
B A	0.78006	8	C23
B	0.72829	8	sene9

A 2.7.2.1.2- Clorofila *b* día 35 bloques I, II, III y IV (Sin transformar)

Class Level Information							
Class	Levels	Values					
Tratamientos	7	C23	sene10	sene11	sene12	sene4	sene5 sene9
Bloques	4	1	2	3	4		

Number of observations 56

Dependent Variable: clorofilaB

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	37.03691786	4.11521310	4.48	0.0003
Error	46	42.28762500	0.91929620		
Corrected Total	55	79.32454286			

R-Square 0.466904 Coeff Var 40.15313 Root MSE 0.958799 clorofilaB Mean 2.387857

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tratamientos	6	15.03181786	2.50530298	2.73	0.0238
bloques	3	22.00510000	7.33503333	7.98	0.0002

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for clorofilaB

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 46
 Error Mean Square 0.919296
 Critical Value of Studentized Range 4.35923
 Minimum Significant Difference 1.4777

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	tratamientos
A	3.2325	8	sene10
B A	2.7738	8	sene12
B A	2.5925	8	sene4
B A	2.5138	8	sene9

B	A	2.1775	8	sene11
B		1.7475	8	sene5
B		1.6775	8	C23

(Transformados con **logaritmo de base 10**)

		Class Level Information						
Class	Levels	Values						
Tratamientos	7	C23	sene10	sene11	sene12	sene4	sene5	sene9
Bloques	4	1	2	3	4			

Number of observations 56

Dependent Variable: CloroBT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	1.15928253	0.12880917	5.29	<.0001
Error	46	1.12060669	0.02436101		
Corrected Total	55	2.27988922			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CloroBT Mean
0.508482	47.33482	0.156080	0.329736

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tratamientos	6	0.40185616	0.06697603	2.75	0.0228
bloques	3	0.75742637	0.25247546	10.36	<.0001

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for CloroBT

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	46
Error Mean Square	0.024361
Critical Value of Studentized Range	4.35923
Minimum Significant Difference	0.2406

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	tratamientos
A	0.45028	8	sene10
B A	0.40167	8	sene4
B A	0.36809	8	sene9
B A	0.36668	8	sene12
B A	0.28974	8	sene11
B A	0.22445	8	sene5
B	0.20724	8	C23

A 2.7.2.2- Experimento 2 – Bloque I y II - Clorofila *b*

A 2.7.2.2.1- Clorofila *b* día 0 bloques I y II

Class	Class Level Information	
	Levels	Values
Tratamientos	6	sene10 sene11 sene12 sene4 sene5 sene9
Bloques	2	1 2

Number of observations 24

Dependent Variable: cloroB

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	6	15.51506667	2.58584444	2.19	0.0957
Error	17	20.10918333	1.18289314		
Corrected Total	23	35.62425000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	cloroB Mean
0.435520	15.24864	1.087609	7.132500

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tratamientos	5	9.55500000	1.91100000	1.62	0.2094
bloques	1	5.96006667	5.96006667	5.04	0.0384

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for cloroB

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	17
Error Mean Square	1.182893
Critical Value of Studentized Range	4.52365
Minimum Significant Difference	2.46

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	tratamientos
A	7.8825	4	sene5
A	7.6975	4	sene4
A	7.4925	4	sene11
A	6.8775	4	sene9
A	6.8125	4	sene12
A	6.0325	4	sene10

A 2.7.2.2.2- Clorofila *b* día 35 bloques I y II

(Sin transformar)

Class	Class Level Information	
	Levels	Values
Tratamientos	6	sene10 sene11 sene12 sene4 sene5 sene9
Bloques	2	1 2

Number of observations 24

Dependent Variable: clorofilaB

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	6	57.0418500	9.5069750	3.07	0.0320
Error	17	52.6832000	3.0990118		
Corrected Total	23	109.7250500			

R-Square 0.519862 Coeff Var 74.99046 Root MSE 1.760401 clorofilaB Mean 2.347500

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tratamientos	5	46.82370000	9.36474000	3.02	0.0394
bloques	1	10.21815000	10.21815000	3.30	0.0871

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for clorofilaB

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 17
 Error Mean Square 3.099012
 Critical Value of Studentized Range 4.52365
 Minimum Significant Difference 3.9817

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	tratamientos
A	4.458	4	sene4
A	3.860	4	sene12
A	2.170	4	sene10
A	1.940	4	sene11
A	1.108	4	sene5
A	0.550	4	sene9

(Transformados con **raíz cuadrada**)

Class Level Information

Class	Levels	Values
Tratamientos	6	sene10 sene11 sene12 sene4 sene5 sene9
Bloques	2	1 2

Number of observations 24

Dependent Variable: cloroBT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	6	5.30283337	0.88380556	3.39	0.0221
Error	17	4.43830392	0.26107670		
Corrected Total	23	9.74113728			

R-Square 0.544375 Coeff Var 36.66925 Root MSE 0.510957 cloroBT Mean 1.393420

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tratamientos	5	4.77915703	0.95583141	3.66	0.0197
bloques	1	0.52367633	0.52367633	2.01	0.1748

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for cloroBT

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	17
Error Mean Square	0.261077
Critical Value of Studentized Range	4.52365
Minimum Significant Difference	1.1557

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	tratamientos
A	1.9331	4	sene12
A	1.9013	4	sene4
B A	1.4311	4	sene10
B A	1.3763	4	sene11
B A	1.0513	4	sene5
B	0.6675	4	sene9

A 2.8- Análisis de Proteínas Foliare Totales Experimento 1 y 2

A 2.8.1- Experimento 1 – Bloque I, II, III y IV - Proteínas

A 2.8.1.1- Proteínas foliares totales día 0 bloques I, II, III y IV

		Class Level Information						
Class	Levels	Values						
Tratamientos	7	C23	sene10	sene11	sene12	sene4	sene5	sene9
Bloques	4	1	2	3	4			

Number of observations 28

Dependent Variable: prott

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0.82294286	0.09143810	5.07	0.0017
Error	18	0.32444286	0.01802460		
Corrected Total	27	1.14738571			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	prott Mean
0.717233	8.501042	0.134256	1.579286

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tratamientos	6	0.09938571	0.01656429	0.92	0.5041
bloques	3	0.72355714	0.24118571	13.38	<.0001

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for prott

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	18
Error Mean Square	0.018025
Critical Value of Studentized Range	4.67313
Minimum Significant Difference	0.3137

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	tratamientos
A	1.66750	4	sene4
A	1.65500	4	sene12
A	1.61000	4	sene11
A	1.54750	4	sene10
A	1.54250	4	C23
A	1.52250	4	sene5
A	1.51000	4	sene9

A 2.8.1.2- Proteínas foliares totales día 35 bloques I, II, III y IV

Class Level Information

Class	Levels	Values
Tratamientos	7	C23 sene10 sene11 sene12 sene4 sene5 sene9
Bloques	4	1 2 3 4

Number of observations 28

Dependent Variable: prott

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0.70762143	0.07862460	2.13	0.0828
Error	18	0.66566429	0.03698135		
Corrected Total	27	1.37328571			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	prott Mean
0.515276	14.61604	0.192305	1.315714

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tratamientos	6	0.46353571	0.07725595	2.09	0.1056
bloques	3	0.24408571	0.08136190	2.20	0.1233

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for prott

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher. Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	18
Error Mean Square	0.036981
Critical Value of Studentized Range	4.67313
Minimum Significant Difference	0.4493

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	tratamientos
A	1.5475	4	sene12
A	1.4050	4	sene4
A	1.3575	4	sene11
A	1.3325	4	C23
A	1.2225	4	sene10
A	1.2075	4	sene9
A	1.1375	4	sene5

A 2.8.2- Experimento 2 – Bloque I y II Proteínas

A 2.8.2.1- Proteínas foliares totales día 0 bloques I y II

Class Level Information							
Class	Levels	Values					
Tratamientos	6	sene10	sene11	sene12	sene4	sene5	sene9
Bloques	2	1	2				

Number of observations 12

Dependent Variable: prott

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	6	1.05451667	0.17575278	6.91	0.0255
Error	5	0.12717500	0.02543500		
Corrected Total	11	1.18169167			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	prott Mean
0.892379	9.870049	0.159484	1.615833

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tratamientos	5	0.28944167	0.05788833	2.28	0.1939
bloques	1	0.76507500	0.76507500	30.08	0.0027

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for prott

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher. Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	5
Error Mean Square	0.025435
Critical Value of Studentized Range	6.03290
Minimum Significant Difference	0.6803

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	tratamientos
A	1.8100	2	sene9
A	1.7500	2	sene12
A	1.6750	2	sene11
A	1.6000	2	sene10
A	1.5200	2	sene4
A	1.3400	2	sene5

A 2.8.2.2- Proteínas foliares totales día 35 bloques I y II

Class Level Information

Class	Levels	Values
Tratamientos	6	sene10 sene11 sene12 sene4 sene5 sene9
Bloques	2	1 2

Number of observations 12

Dependent Variable: prott

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	6	1.34713333	0.22452222	7.79	0.0198
Error	5	0.14416667	0.02883333		
Corrected Total	11	1.49130000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	prott Mean
0.903328	15.50720	0.169804	1.095000

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tratamientos	5	1.31510000	0.26302000	9.12	0.0149
bloques	1	0.03203333	0.03203333	1.11	0.3401

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for prott

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher. Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	5
Error Mean Square	0.028833
Critical Value of Studentized Range	6.03290
Minimum Significant Difference	0.7244

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	tratamientos
A	1.3550	2	sene10
A	1.3200	2	sene4
A	1.2350	2	sene12
A	1.2150	2	sene11
B A	1.0600	2	sene5
B	0.3850	2	sene9

ANEXO 3

- Soluciones Medios de cultivo - *Southern blot* - Proteínas Foliares - X-Gluc - Geles SDS-PAGE - Marcador 1Kb *ladder* -- Marcador de referencia para proteínas #SMO441 - Marcador MKIII *Southern blot*

A 3.1- Medios de cultivo para material vegetal expresado en mg/l

	SHK	MS [½]
NH₄NO₃		825
NH₄H₂PO₄	300	
KNO₃	2500	950
CaCl₂·2H₂O	200	220
MgSO₄·7H₂O	400	185
KH₂PO₄		85
K₂SO₄	4350	
KI	1	0,415
H₃BO₃	5	3,1
MnSO₄·H₂O	10	11,15
ZnSO₄·7H₂O	1	4,3
Na₂MoO₄·2H₂O	0,1	0,125
CuSO₄·5H₂O	0,2	0,0125
CoCl₂·6H₂O	0,1	0,0125
Na₂ EDTA		18,5
Na Fe EDTA	25	
FeSO₄·7H₂O		13,9
Prolina	288	
Thioprolina	53	
Myo-inositol	200	50
Ácido nicotínico	5	0,25
Pyridoxina HCl	0,5	0,25
Tiamina HCl	5	0,05
2,4 – D	1	
Kinetina	0,2	
Sacarosa	30000	20000
Medio gelificante	6500	2500
pH	5,8	5,8

A 3.2- Medios cultivo bacterias

- Medio YMB

	Concentración
Manitol	10 g/l
K ₂ HPO ₄	0,5 g/l
Extracto de levadura	0,4 g/l
NaCl	0,5 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g/l
pH	7 – 7,2
Llevar a volumen con agua deionizada	

- MinA líquido

	Concentración
K ₂ HPO ₄	5,25 g/l
KH ₂ PO ₄	2,25 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g/l
Citrato de sodio dihidratado	0,25 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g/l
Glucosa	1 g/l
pH	7
Llevar a volumen con agua deionizada	

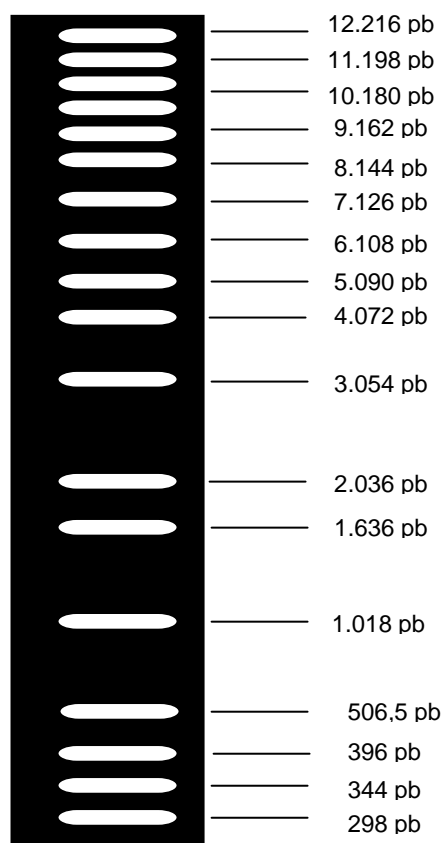
- MinA semisólido

Este medio tiene la misma composición que el anterior, solo debe agregarse 5 gramos de agar por litro de medio.

A 3.3- Antibióticos

	Concentración
Rifampicina	[100 mg/l]
Estreptomicina	[300 mg/l]
Spectinomicina	[100 mg/l]
Carbenicilina	[100 mg/l]

A 3.4-Marcador de peso molecular 1Kb ADN *ladder* de Invitrogen



A 3.5- Soluciones para *Southern blot*

- Solución de depurinación

Concentración	
HCl	0,25 M

- Solución de desnaturalización

Concentración	
NaOH	0,5 M
NaCl	1,5 M
Autoclavar	

- Solución de neutralización

Concentración	
Tris-HCl pH: 7,5	0,5 M
NaCl	2,5 M
Autoclavar	

- Solución stock 20x SSC

Concentración	
NaCl	3 M
Citrato de Na	0,3 M
pH	7
Autoclavar	

- **N-lauroylsarcosine** solución stock
10% (w/v) en H₂O
Filtrado con membrana 0,2-0,45 µm.

- **SDS** solución stock
10% (w/v) en H₂O
Filtrado con membrana 0,2-0,45 µm.

- **Blocking reagent** solución stock.
BR disuelto en buffer ácido Maleico.
(0,1 M ácido Maleico, 0,15 M NaCl).
10% (w/v).
Agitación y calor. Filtrar y autoclavar. Guardar a 4° o -20°C.

- **Buffer estándar de hibridación**
5x SSC
0,1% N-lauroylsarcosine
0,2% SDS
1% BR (de 10% BR stock sc.).
Filtrar y autoclavar.

- **Solución de lavado 2x**
2x SSC
0,1% SDS

- **Solución de lavado 0,2x**
0,2x SSC
0,1% SDS

- **Solución de lavado 0,1x**
0,1x SSC
0,1% SDS

- **Buffer ácido maleico**

	Concentración
Ácido Maleico	0,1 M
NaCl	3 M
pH (con NaOH sólido)	8
Autoclavar	

- **Buffer de lavado**
0,3% (w/v) Tween 20 en *buffer* ácido Maleico

- **Buffer de bloqueo** (1% BR)
Diluir ¹/₁₀ BR solución stock en *buffer* ácido Maleico

- **Buffer de detección**

	Concentración
Tris-HCl pH: 9,5	100 mM
NaCl	100 mM
Autoclavar	

- Solución de estripeno alcalina

	Concentración
NaOH	0,2 N
SDS	0,1 %
Autoclavar	

A 3.6- Tinción Histoquímica X-Gluc

X-Gluc [50 mM Na₂HPO₄; 50 mM NaH₂PO₄ (pH 7.0); 10 mM EDTA; 0,5 mM K₃Fe(CN)₆; 0,5 mM K₄Fe(CN)₃. 3 H₂O; 0.1 % Triton X-100; 1 mg·ml⁻¹ X-Gluc]

A 3.7- Soluciones para extracción Proteínas Foliares

- PMSF (inhibidor de proteasas)

1mM de flururo de fenil metil sulfonilo.

- Buffer PBS

	Concentración
NaCl	8 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄ .12.H ₂ O	3 g/l
KCl	0,2 g/l

A 3.8- Soluciones para Geles SDS-PAGE

- Solución Tris 1M (conservar a 4°C)

12,114 g/100 ml HPLC

pH: 8,8 y pH: 6,8

- Acril Bis-acrilamida (conservar a 4°C y cubierto con papel aluminio)

40 g Acrilamida

1,1 g Bis-Acrilamida

Llevar a 100 ml con HPLC

- Persulfato de Amonio 10% (APS) (conservar a -20°C)

10 g en 100 ml de HPLC

- Buffer corrida (10x) (conservar a 4°C) (por litro)

	Concentración	Concentración	Concentración
Tris base 0,25 M	3,038 g / 100ml	15,1 g	25 mM
Glicina 2 M	15,01 g/ 100ml	71 g	192 mM
SDS 10% 1%	1 g / 100ml	50 ml	0,1%
pH: 8,3			

- Buffer transferencia (conservar a 4°C)

	Concentración
Tris base	11,64 g
Glicina	5,86 g
Metanol	400 ml
SDS 20%	3,75 ml

- Buffer Loading [2x]

	Concentración
Tris HCl pH:6.8	0,1M
Mercaptoetanol	2%
Glicerol	20%
SDS	4%
Azul de Bormo Fenol	0,2%

- Solución de Decoloración rápida

	Concentración
Ácido Acético Glacial	10 ml
Metanol	50 ml
Llevar a volumen con 40 ml de agua destilada	

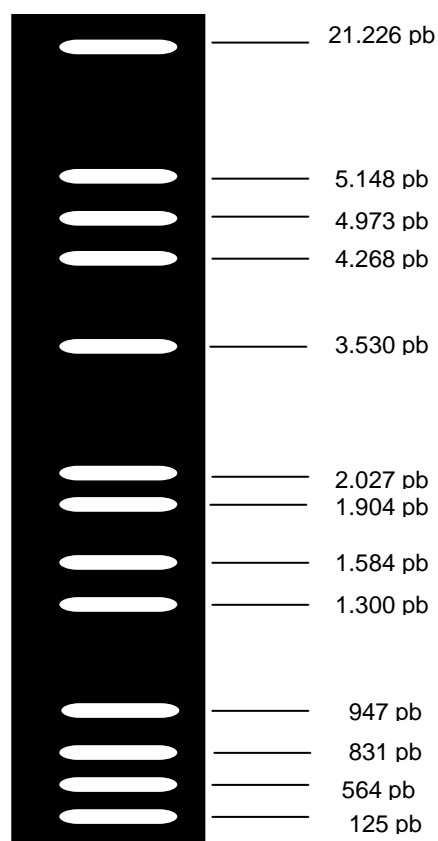
- Solución Coomassie

	Concentración
Ácido Acético Glacial	10 % (v/v)
Metanol	50 % (v/v)
Coomasie Blue R-250	0,25% (w/v)

A 3.9- Marcador de referencia para proteína #SMO441 - Fermentas

Proteínas	Fuente	MW, kDa
β -galactosidase	<i>E. coli</i>	117,0
Bovine serum albumin	<i>Bovine plasma</i>	85,0
Ovalbumin	<i>Chicken egg white</i>	48,0
Carbonic anhydrase	<i>Bovine erythrocytes</i>	34,0
B-lactoglobulin	<i>Bovine milk</i>	26,0
Lysozyme	<i>Chicken egg white</i>	19,0

A 3.10- Marcador MKIII utilizado en Southern blot



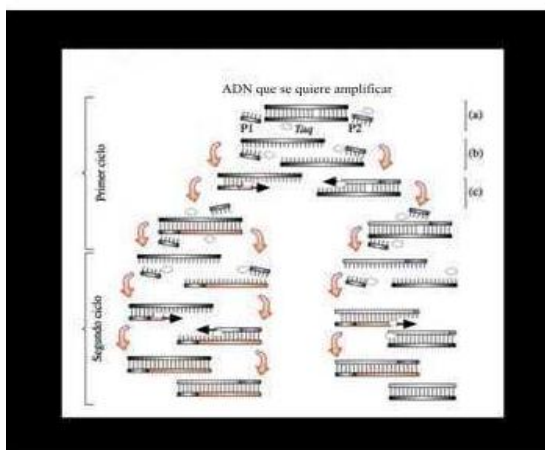
A 3.11- Etapas de la reacción de PCR

La reacción se lleva a cabo en una serie de ciclos cada uno de los cuales incluye tres fases o pasos:

- **Desnaturalización:** Para que comience la reacción es necesario que el ADN molde se encuentre en forma de cadena sencilla. Esto se consigue aplicando temperaturas de 90 a 95°C que producen la rotura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y por lo tanto la separación de ambas cadenas. Para conseguir la completa separación de las hebras de toda la muestra esta temperatura debe mantenerse unos minutos. Si el ADN solo se desnaturaliza parcialmente éste tenderá a renaturalizarse rápidamente, evitando así una eficiente hibridación de los *primers* y una posterior extensión.

- **Hibridación:** Esta fase se denomina también fase de *annealing*. Una vez que el ADN está desnaturalizado se disminuye la temperatura hasta un rango comprendido entre los 40 y los 60°C para que se pueda producir la unión de los *primers* a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar. La temperatura de fusión o *annealing* (T_m , *melting temperature*) depende de varios factores y es relativamente específica para cada *primer*. La longitud de los *primers* y la secuencia son críticas en la designación de los parámetros de una amplificación, una fórmula simple para calcular la T_m es la siguiente: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$. No obstante, cada *primer* exige una serie de estudios experimentales para determinar su temperatura de *annealing* específica ya que si la temperatura es muy baja la unión se hará de forma inespecífica y si es muy alta no se producirá una unión completa.

- **Extensión:** Durante este paso la *Taq polimerasa* incorpora nucleótidos en el extremo 3' del *primer* utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada. La temperatura a la que se lleva a cabo este paso suele ser de 72°C ya que es la temperatura a la que la *Taq polimerasa* alcanza su máxima actividad. Normalmente una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pb, y 40 segundos para fragmentos por encima de 1.2Kb.



Reacción en cadena de la polimerasa. a) ADN molde previo a la desnaturalización, b) Hibridación y c) Extensión. P1 y P2: *primer* 1 y 2.

Un factor importante en el transcurso de las diferentes fases es el tiempo de rampa. Este se define como el tiempo invertido en pasar de una temperatura a otra y depende del diseño y de las características del termociclador, aparato donde se realiza automáticamente este proceso. En las nuevas generaciones de termocicladores este factor se ha ido optimizando para hacerlo mínimo.

A 3.12- Componentes de la PCR

- **Buffer de amplificación:** Los *buffer* de PCR que se utilizan normalmente contienen KCl, Tris y $MgCl_2$. El $MgCl_2$ es el componente que más influye en la especificidad y rendimiento de la reacción ya que los iones Mg^{2+} son necesarios para la actividad de la *Taq polimerasa*, actuando como cofactor, y además afectan la astringencia del apareamiento del *primer*. Un exceso del mismo origina una acumulación de productos inespecíficos y una cantidad insuficiente hace que disminuya el rendimiento de la amplificación.

- **Primers:** La longitud de cada uno de los *primers* debe estar comprendida entre 18 y 24 bases. Una mayor longitud no aumenta el rendimiento y una menor longitud quita especificidad. Ambos *primers* deben tener una temperatura de fusión similar. La *relación bases púricas: bases pirimidínicas* debe ser 1:1 (o como mucho 40-60%).

- **Desoxinucleótidos trifosfatos:** Las concentraciones de dNTPs que suelen usarse están en torno a 200 μM para cada uno de ellos. La concentración de dNTPs y de $MgCl_2$ está relacionada ya que el Mg se une a los dNTPs con lo que concentraciones elevadas de dNTPs inhibirían la reacción al no tener la *Taq polimerasa* suficiente Mg como para incorporar dNTPs.

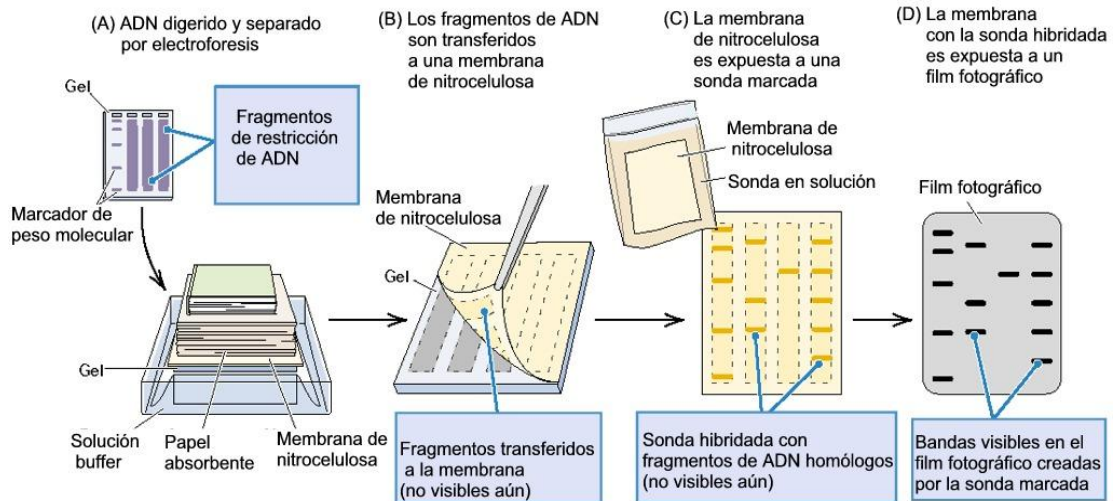
- **Taq-polimerasa:** Las cantidades óptimas de *Taq polimerasa* necesarias para la síntesis de ADN están alrededor de 2 unidades en 25 μl de volumen final de reacción. La actividad de esta enzima se ve influenciada por la concentración de dNTPs, de Mg^{2+} y de algunos iones monovalentes de manera que concentraciones elevadas de los mismos inhiben dicha actividad.

- **ADN molde o templado:** Es ADN que la *Taq polimerasa* utiliza como molde para la síntesis de nuevas cadenas polinucleotídicas. Si bien la cantidad de ADN necesaria para la PCR es muy baja, la calidad es importante. Cuando se trabaja con ADN cuya calidad es óptima no suele haber problemas en la amplificación. El problema aparece cuando la calidad del ADN obtenido no es la adecuada, bien porque esté degradado o bien porque dicho ADN vaya ligado a una serie de contaminantes que pueden inhibir la actividad de la polimerasa.

Una de las grandes ventajas de la PCR es su elevada sensibilidad, en ocasiones puede convertirse en un gran problema ya que se podría co-amplificar un ADN extraño o ajeno al que nos interesa. Por ello, las medidas de precaución que se toman en los laboratorios para evitar problemas de contaminación por manipulación son extremas. Una vez amplificado el ADN, los fragmentos resultantes son separados en función de su tamaño por medio de un proceso de electroforesis.

A 3.13 – Hibridación molecular por Southern

Éste es digerido con enzimas de restricción y los fragmentos son separados por tamaños mediante electroforesis en gel de agarosa. Una vez separados los fragmentos al estado de cadena simple son transferidos a membranas de nylon o nitrocelulosa. Para ello el gel se sumerge en una base para desnaturalizar los fragmentos de ADN y luego se coloca sobre una pieza de papel cuyos extremos se suspenden en un reservorio con una solución salina. La membrana se coloca encima del gel y sobre aquella se colocan papel absorbente (Figura 7).



Esquema de hibridación molecular por el método del *Southern*.

Se crea así un flujo por acción capilar desde el reservorio y que atraviesa el gel arrastrando los fragmentos de ADN que entonces son transferidos a la membrana con lo que en el filtro queda representada una réplica de la disposición de los fragmentos de ADN presentes en el gel. El ADN se fija a la membrana por calor o por exposición a UV. La membrana así preparada está pronta para someterla a hibridación con una sonda. A continuación el filtro se incuba durante un tiempo con la sonda de cadena simple marcada (radiactivamente o no radiactivamente); durante la incubación la sonda se va hibridando a las moléculas de ADN de cadena sencilla de secuencia complementaria (o muy parecida). Tras el período de hibridación, la muestra se lava para remover la sonda no hibridada. La sonda unida al fragmento de ADN complementario se puede visualizar en el filtro de una forma sencilla mediante una exposición a una película de rayos X para el caso de sondas radiactivas o con una película sensible a la luz, para el caso de sondas por luminiscencia.